

Untersuchung von Ribonucleinsäuren und Ribonuclein-
säure-Protein-Komplexen in Hühnerembryonen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Chemie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Walter Knöchel

aus Marburg/Lahn

1972

Untersuchung von Ribonucleinsäuren und Ribonuclein-
säure-Protein-Komplexen in Hühnerembryonen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Chemie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Walter Knöchel

aus Marburg/Lahn



1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Riemschneider

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 12. 1972

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann am Institut für Physiologische Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann bin ich für die Überlassung des Themas zu Dank verpflichtet. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine in zahllosen Diskussionen geäußerten Ratschläge und Einwände bedeuteten für mich eine wertvolle Hilfe bei der Planung und der Durchführung der Versuche.

Herrn Dr. H. Grunz und Frau G. Arkenberg danke ich für die mit viel Mühe und großer Sorgfalt durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich Embryonale Entwicklung und Differenzierung) danke ich für finanzielle Unterstützung.

Im Text gebrauchte Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
CMP	Cytidimonophosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
RNS	Ribonucleinsäure
t-RNS	transfer-Ribonucleinsäure
r-RNS	ribosomale Ribonucleinsäure
m-RNS	messenger-Ribonucleinsäure
DNS	Desoxyribonucleinsäure
RNP	Ribonucleinsäure-Protein-Komplex = Ribonucleoprotein-Komplex
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
S	Sedimentationskonstante in Svedbergeinheiten (S) (S) = 10^{-13} sec
Ac D	Actinomycin D



Digitized by the Internet Archive
in 2026

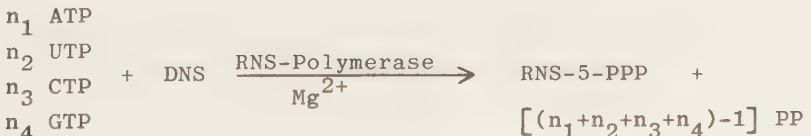
INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	5
2. <u>Ziel der Arbeit</u>	11
3. <u>Methoden und Material</u>	12
3.1. Applikation von [^3H] Uridin und [^{14}C] Uridin (Doppelmarkierung)	12
3.2. Herstellung und Applikation einer Actino- mycin D Lösung	12
3.3. Präparation des postmitochondrialen Über- standes	13
3.4. Isolierung von Zellkernen	13
3.5. Präparation von Ribonucleinsäuren	14
3.6. Gradientenzentrifugation	14
3.6.1. Zonengradienten	14
3.6.2. Isopyknische Gradienten	15
3.7. Gradientenfraktionierung und Extinktions- messung	15
3.8. Messung der Radioaktivität	16
3.9. Berechnung der Sedimentationskonstante in Saccharose- und der Schwebedichte in CsCl- Gradienten	17
3.10. Elektronenmikroskopie	17
3.11. Puffer	18
3.12. Chemikalien	19
4. <u>Ergebnisse</u>	20
4.1. Radioaktive Markierung der RNS	20
4.2. Analyse der doppelmarkierten RNS mit Sac- charosegradienten	21

	<u>Seite</u>
4.3. Schwebedichten der Ribonucleoprotein-Komplexe	26
4.4. Präparation des postmitochondrialen Überstandes in Gegenwart von Triton X 100	31
4.5. Extraktion der RNS aus dem postmitochondrialem Überstand	33
4.6. Intrazelluläre Lokalisation der Ribonucleoprotein-Komplexe	35
4.7. Lokalisation der schnell markierten RNS innerhalb der Kerne	38
4.8. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Kerne	40
4.9. Sensitivität der RNP-Partikel gegen Ribonuclease	45
4.10. Untersuchung der RNP-Partikel nach Applikation von Actinomycin D	47
5. <u>Diskussion</u>	52
6. <u>Zusammenfassung</u>	59
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	61

1. Einleitung

Alle bekannten zellulären Ribonucleinsäuren werden bei Eukaryonten im Zellkern in einer DNS-abhängigen, enzymkatalysierten Reaktion synthetisiert. Bei diesem als Transkription bezeichneten Vorgang wird der sogenannte codogene DNS-Strang von der DNS-abhängigen RNS-Polymerase entsprechend dem Basenpaarmechanismus abgelesen. Zur Synthese sind neben Magnesiumionen die Ribosidtriphosphate aller vier für Ribonucleinsäuren typischen Basen (Adenin, Uracil, Cytosin, Guanin) erforderlich. Vereinfachend läßt sich die Reaktion nach Harbers¹ wie folgt beschreiben:



Die auf diese Weise von der DNS an die RNS weitergeleitete Information wird dann auf der Stufe der Translation, bei der die eigentliche Proteinbiosynthese stattfindet, in die Sequenz der Aminosäuren umgesetzt.

Der Schritt zwischen Transkription und Translation, nämlich die Modifikation und der Transport der synthetisierten Ribonucleinsäuren, nimmt für die Proteinbiosynthese eine überaus wichtige, wenngleich auch noch weitgehend ungeklärte Rolle ein. Für die Synthese und die Modifikation läßt sich nach dem augenblicklichen Wissensstand zusammengefaßt folgendes aussagen:

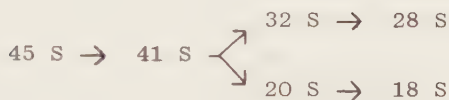
a.) Transfer-Ribonucleinsäure (t-RNS)

Bei der Biosynthese im Zellkern werden die t-RNS-Gene so transkribiert, daß sehr große t-RNS-Vorläufer-Moleküle entstehen, die im Vergleich zur "reifen" t-RNS an beiden Enden zusätzliche und insgesamt weniger modifizierte Nucleotide enthalten (R. H. Burdon und A. E. Glason², D. E. Bernhardt und J. E. Darnell³, J. E. Kay und H. L. Cooper⁴, S. Altmann⁵). Diese Vorläufer werden durch zahlreiche Enzyme in ihren Basen stark modifiziert und durch spezifische Nucleasen ("trimming enzymes") zu funktionellen t-RNS-Molekülen abgebaut (D. Söll⁶). Gleichzeitig wird am 3'-OH-Ende des fertiggestellten t-RNS-Moleküles das anscheinend nicht durch t-RNS-Gene codierte Cytosin-Cytosin-Adenin-Ende angehängt (V. Daniell et al.⁷). Die Addition dieser Nucleotide kann durch die t-RNS-CMP-AMP-Pyrophosphorylase katalysiert werden (D. S. Carre et al.⁸).

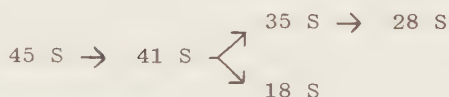
b.) Ribosomale Ribonucleinsäure (r-RNS)

In den Nucleolen werden Ribonucleoprotein-Teilchen synthetisiert, die eine 45 S RNS enthalten. Der Abbau dieser RNP-Teilchen, beziehungsweise der in ihnen enthalte-

nen RNS, vollzieht sich nach D. Grierson et al.⁹ entsprechend folgendem Schema:



oder:



Zumindest der erste Schritt wird von partiellen Methylierungen begleitet. Ähnlich diesem durch eine Endonuclease bewirktem Abbau der RNS (M. E. Mirault und K. Scherrer¹⁰) wird auch ein Teil des Proteins abgespalten. Während der RNS-Abbau jedoch auf die Nucleolen bzw. den Kern beschränkt bleibt - im Cytoplasma wurden bisher nur 18 S und 28 S r-RNS gefunden - vollzieht sich die Proteinabspaltung im Cytoplasma (D. Chen et al.¹¹). Als Endprodukt der "Reifung" entstehen die kleine Untereinheit (40 S) mit der 18 S r-RNS und die große Untereinheit (60 S) mit der 28 S r-RNS. In diesem Zusammenhang ist noch eine niedermolekulare 5 S RNS als Bestandteil der großen Untereinheit zu erwähnen.

c.) Messenger-Ribonucleinsäure (m-RNS)

Über die Synthese und die Modifikation der m-RNS, der die eigentliche Informationsübertragung von der DNS zum Protein zugeschrieben wird, sind nur wenige Tatsachen bekannt.

Man nimmt an, daß eine im Kern synthetisierte, sehr hochmolekulare RNS, die gebundenes Protein enthält, als Vorläufer der m-RNS dient (K. Scherrer und L. Marcaud¹², G. P. Georgiev¹³, R. Soeiro und J. E. Darnell¹⁴).

Im Cytoplasma findet man freie und polysomengebundene heterodisperse RNS, wobei die letztere nach ihrer Funktion eindeutig als m-RNS charakterisiert ist. Die heterodisperse, nichtribosomale RNS tritt in Zellen höherer Organismen in Form von Komplexen mit Protein auf.

A. S. Spirin et al.¹⁵, die erstmals die Existenz dieser Teilchen beschrieben, nannten sie "Informosomen". Sie nahmen an, daß m-RNS in Form solcher Komplexe vom Zellkern in das Cytoplasma transportiert wird, wo die Proteinbiosynthese stattfindet. Unter der Voraussetzung, daß zumindest ein Teil der freien Ribonucleoprotein-Komplexe später als m-RNP in die Polysomen eingebaut wird, ergibt sich folgendes Schema:

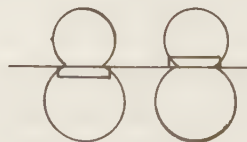
Kern: hochmolekulare
 RNP-Partikel



Cytoplasma: niedermolekulare,
 freie RNP-Partikel



in Polysomen einge-
baute RNP-Partikel
(= funktionelle m-RNP-
Partikel)



Ribosomen

Obwohl es eine Reihe von Hinweisen auf die dargestellten Zusammenhänge zwischen hochmolekularen Kern-RNP-Partikeln, niedermolekularen, freien und funktionellen m-RNP-Partikeln gibt (Untersuchung der Basenzusammensetzung, Kinetik der radioaktiven Markierung, kompetitive Hybridisierung mit

DNS), steht der endgültige Beweis für einen biogenetischen Zusammenhang noch aus.

Während der letzten Jahre erschienen zahlreiche Arbeiten über die Existenz freier und polysomengebundener nichtribosomaler RNP-Komplexe im Cytoplasma eukaryotischer Zellen (G. Attardi et al.¹⁶, R. P. Perry und D. E. Kelly¹⁷, F. C. Kafatos¹⁸, E. C. Henshaw¹⁹, A. S. Spirin²⁰, A. Burny et al.²¹, G. Cartouzou et al.²², E. C. Henshaw und J. Loebenstein²³, G. Spohr et al.²⁴, D. Fromson und M. Nemer²⁵, S. Y. Lee et al.²⁶, S. Olsnes²⁷, B. Lebleu et al.²⁸, D. M. Woodcock und J. N. Mansbridge²⁹). Obwohl das Informationsmodell schon 1964 aufgestellt wurde, blieben trotzdem viele Fragen nach der Natur und der Funktion dieser Komplexe bis heute unbeantwortet.

Die Hauptschwierigkeit bei Untersuchungen über die nichtribosomale RNS liegt darin, daß sie nur 1 - 3 % der cytoplasmatischen RNS ausmacht. Man ist deshalb auf sehr empfindliche analytische Methoden angewiesen. So wurde in fast allen Fällen die Existenz dieser RNP-Komplexe durch Markierung mit radioaktiven RNS-Vorläufern nachgewiesen. Dabei wurde das Problem, wie eine selektive Markierung der nichtribosomalen RNS zu erreichen war, durch verschiedene Methoden gelöst.

a.) Während der Embryogenese wird bis zum Ende des Gastrulastadiums keine (M. A. Ajtkhozshin et al.³⁰, D. D. Brown und E. Littna³¹) oder im Vergleich zur heterodispersen RNS nur sehr wenig (Ch. P. Emerson und T. Humphreys³²) ribosomale RNS synthetisiert. Die Hauptmenge der neusynthetisierten RNS stellt also heterodisperse RNS dar.

b.) Applikation geringer Dosen von Actinomycin D führt in-

folge einer Anlagerung (I. H. Goldberg und P. A. Friedman³³) dieser Substanz an die für die ribosomale RNS-Synthese verantwortlichen DNS-Gene zu einer selektiven Hemmung der RNS-Synthese. Während keine weitere ribosomale RNS synthetisiert wird, steigt die Menge der heterodispersen RNS im Cytoplasma weiter an (R. P. Perry³⁴, P. Georgiev et al.³⁵).

c.) Nach einer Inkubation mit radioaktiven RNS-Vorläufern erscheinen die unterschiedlichen RNS-Arten nach verschiedenen Zeiten im Cytoplasma. In Experimenten an Zellkulturen und an Rattenleber wurde gezeigt, daß die heterodisperse RNS nach etwa 5 bis 10 Minuten, die 18 S RNS der kleinen ribosomalen Untereinheit nach 15 bis 25 Minuten und die 28 S RNS der großen ribosomalen Untereinheit nach 45 bis 60 Minuten im Cytoplasma erscheinen (R. P. Perry und D. E. Kelly¹⁷, S. Penman³⁶).

Insbesondere die letzte Methode erscheint von Vorteil, da hier ohne die Anwendung von Substanzen, die die Transkription oder die Translation beeinflussen, das Auftreten von RNP-Komplexen in vivo untersucht werden kann.

2. Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die Synthese und das Vorkommen von nichtribosomalen und von ribosomalen Ribonucleinsäuren zu untersuchen. Hühnerembryonen schienen als Untersuchungsmaterial geeignet, weil dieses schnell wachsende und sich differenzierende Gewebe eine hohe RNS Synthese aufweist. Die neusynthetisierten Ribonucleinsäuren sollten nach ihrer Größe und ihren Eigenschaften charakterisiert werden. Insbesondere war zu untersuchen, ob sie gebundenes Protein enthielten, d. h., ob das Informosomenmodell auch bei Hühnerembryonen Gültigkeit besitzt.

Da die nichtribosomale RNS, wie bereits erwähnt, nur in sehr geringen Mengen auftritt, war zu ihrem Nachweis eine Markierung mit radioaktiven RNS-Vorläufern vorzunehmen. Zur Differenzierung der einzelnen RNS-Arten sollten nach Gabe der radioaktiven RNS-Vorläufer verschiedene Inkubationszeiten gewählt werden.

3. Methoden und Material

3.1. Applikation von [^3H] Uridin und [^{14}C] Uridin (Doppelmarkierung)

Als Ausgangsmaterial dienten 11 Tage im Brutschrank bei 37 °C bebrütete Hühnerembryonen. Die Schale über der Luftblase wurde entfernt und nach Anfeuchten mit dest. Wasser wurde die Eihaut vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen. 2 μCi [^{14}C] Uridin, mit 0,9 % NaCl-Lösung auf 0,2 ml verdünnt, wurden auf die Chorioallantoismembran getropft. Das Loch in der Schale wurde mit Tesafilm überklebt und die Eier wurden zur Inkubation wieder für 24 Stunden in den Brutschrank gelegt. Nach dieser Langzeitmarkierung wurden zur Kurzzeitmarkierung 300 μCi [$5\text{-}^3\text{H}$] Uridin mittels eines Mikromanipulators in eine Chorioallantoisvene injiziert und die Embryonen erneut 15, 30 oder 60 Minuten inkubiert.

3.2. Herstellung und Applikation einer Actinomycin D Lösung

Zur Herstellung einer Lösung von 200 γ/ml wird 1 mg Actinomycin D in 250 μl 96 % Äthanol aufgenommen und mit 4,75 ml dest. Wasser auf 5 ml aufgefüllt. Unter einem Binokular müssen die noch nicht gelösten Kristalle mittels eines Glasstabes einzeln verrieben werden.

Bei den Experimenten mit Actinomycin D wurden 11 Tage alten Embryonen, die mit 300 μCi [^3H] Uridin für 15 Minuten vorinkubiert worden waren, 80 γ Actinomycin D mittels des Mikromanipulators in eine Chorioallantoisvene injiziert und die Embryonen erneut 60, 120 oder 240 Minuten inkubiert.

3.3. Präparation des postmitochondrialen Überstandes

Nach der Inkubation wurde der Inhalt je eines Eies vorsichtig in eine Kristallisierschale mit Ringer-Citrat-Lösung (37 °C) überführt. Die Amnionhöhle wurde geöffnet, der Embryo herausgenommen, und die Nabelgefäße wurden durchgeschnitten. Nach weitgehender Entblutung des Embryos wurden Kopf, Extremitäten und Eingeweide entfernt.

Die nun folgenden Arbeiten wurden im Eisbad und mit kalten Lösungen durchgeführt. Der Rumpf wurde in 2 Volumen (Gewicht/Volumen) A Puffer aufgenommen und mittels eines locker eingepaßten Dounce Homogenisators mit 3 - 5 Strokes homogenisiert. Bei einigen Versuchen wurden vor dem Homogenisieren 0,5 % Triton X 100 zugesetzt. Das Homogenat wurde bei 0 °C 10 Minuten bei 10 000 x g und danach noch einmal 10 Minuten bei 15 000 x g im Spinco Ti 50 der präparativen L 2 Beckmann Ultrazentrifuge zentrifugiert, um nichtaufgeschlossenes Gewebe, Kerne und Mitochondrien zu entfernen. Die Sedimente wurden verworfen, ein Aliquot des postmitochondrialen Überstandes (0,2 ml) zur Aktivitätsmessung entnommen, der Rest wurde eingefroren und bei - 30 °C in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt.

3.4. Isolierung von Zellkernen

Die Embryonen wurden wie bereits beschrieben aufgearbeitet und homogenisiert. Auch hier wurde bei einigen Versuchen vor dem Homogenisieren 0,5 % Triton X 100 zugesetzt. Das Homogenisat eines Embryos wurde 15 Minuten bei 1 200 x g und 0 °C zentrifugiert, das erhaltene Sediment, eine rohe Kernfraktion, in 3 ml A Puffer aufgenommen und erneut 15 Minuten bei 1 200 x g abzentrifugiert. Die Kerne wurden in 1 ml A Puffer aufgenommen, mit 4 ml einer Lösung von 0,8 m Saccharose in B Puffer unterschichtet und für 15

Minuten bei 2 500 x g zentrifugiert. Das Kernsediment wurde in 2 ml A Puffer aufgenommen. Kontrollbetrachtungen der Präparate im Phasenkontrastmikroskop zeigten Kerne, die weitgehend frei von cytoplasmatischen Verunreinigungen zu sein schienen.

3.5. Präparation von Ribonucleinsäuren

Ribonucleinsäuren wurden aus dem postmitochondrialen Überstand nach der Phenol-Dodecylsulfat-Methode gewonnen (H. S. Kirby³⁷, H. Tiedemann und H. Tiedemann³⁸, F. Gros et al.³⁹). 1 ml postmitochondrialer Überstand wurde mit einer 10 %igen wäßrigen Natriumdodecylsulfat-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 % versetzt, 1 ml frisch destilliertes 80 % Phenol hinzugegeben und die Emulsion 10 Minuten bei 25 °C gut verrührt. Nach einer Zentrifugation von 20 Minuten bei 2 500 x g wurde die wäßrige Phase mit einer Pasteurpipette abgenommen und in der gleichen Weise noch einmal extrahiert. Die Ribonucleinsäuren wurden schließlich durch Zugabe von 2 Volumen 96 % Äthanol aus der wäßrigen Phase gefällt, über Nacht bei - 20 °C stehen gelassen und zweimal mit 66 % Äthanol, der 0,5 % NaCl enthält, gewaschen. Das Ribonucleinsäurepräzipitat wurde in 1 ml C Puffer aufgenommen.

3.6. Gradientenzentrifugation

3.6.1. Zonengradienten

Zur Durchführung von Saccharosegradientenzentrifugationen wurden Gradienten von 10 - 30 % (Gewicht/Volumen) Saccharose in B Puffer oder - wenn EDTA-behandeltes Material eingesetzt wurde - in C Puffer mit je 0,5 ml Material überschichtet. Die Formung der Gradienten und die Materialüber-

Schichtung wurden bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Die Gradienten wurden in einem Spinco SW 41 Rotor der präparativen L2 Beckman Ultrazentrifuge für die jeweils im Text angegebenen Zeiten zentrifugiert.

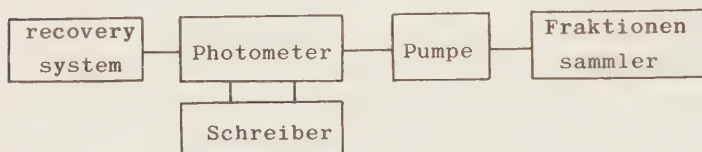
3.6.2. Isopyknische Gradienten

Bestimmte Fraktionen der Saccharosegradienten wurden mittels einer isopyknischen Zentrifugation in CsCl weiter untersucht. Die Fraktionen wurden vereinigt, gut durchmischt und mit einer 36 % Formaldehydlösung auf eine Endkonzentration von 6 % gebracht. Die Fixierung von Ribonucleoprotein-Komplexen mit Formaldehyd, bei der eine Vernetzung der RNS mit Proteinen über Methylenbrücken auftritt, ist notwendig, da anderenfalls in Salzlösungen hoher Konzentration RNS und gebundenes Protein dissoziieren (A. S. Spirin et al.⁴⁰). Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 2 °C wurde in Visking-Schläuchen 48 Stunden gegen S Puffer oder - wenn EDTA-behandeltes Material eingesetzt wurde - gegen SE Puffer dialysiert. Die Dialysierpuffer wurden je zweimal gewechselt. Nach Zugabe von CsCl bis zu einer Endkonzentration von 42 % (Gewicht/Gewicht) wurden die Lösungen in einem Spinco SW 65 Rotor der präparativen L2 Beckman Ultrazentrifuge 48 Stunden bei 25 °C und 50 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert.

3.7. Gradientenfractionierung und Extinktionsmessung

Zur Eluierung der Gradienten wurden die Röhrchen in ein "recovery system" (Beckman) eingespannt und mit einer durchbohrten Nadel am Boden angestochen. Durch Einschalten einer peristaltischen Pumpe wurde der Gradient mit einer konstanten Geschwindigkeit eluiert.

Die Extinktion wurde bei 254 nm kontinuierlich mit einem LKB Uvicord II Photometer (Lichtweg der Durchflußzelle: 0,3 cm) gemessen, an das ein Beckman 10" Schreiber angeschlossen war. Die Fraktionierung erfolgte in einem LKB 7 000 Ultro Rac Fraktionensammler. Die Anordnung des Systems ist aus folgendem Schema zu ersehen:



3.8. Messung der Radioaktivität

Zu jeder Fraktion wurden 0,3 ml einer wäßrigen Rinderalbumin-Lösung als Träger hinzugesetzt und gut durchmischt. Nach Zugabe von 0,2 ml 25 % Trichloressigsäure und nach erneutem Mischen wurden die Fraktionen 5 Minuten stehen gelassen, wobei sämtliches hochmolekulares durch Trichloressigsäure fällbares Material ausfiel.

Das abzentrifugierte Sediment wurde zweimal in je 1 ml 5 % Trichloressigsäure suspendiert, abzentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes wenige Minuten unter Wasserstrahlvakuum in einem Exsiccator getrocknet. Das Sediment wurde in 0,5 ml Hyamin (1 m in Methanol) gelöst und 15 Minuten bei 57 °C erwärmt. Nach Aufnahme in 10 ml einer Lösung von 4 g Omnifluor/l Toluol wurden die Aktivitäten der Proben in einem Beckman LS 150 Szintillationszähler gemessen.

Bei Proben mit [^3H] und [^{14}C] markiertem Material wurde an-

hand einer Eichkurve mittels des Quenchgrades der "spill over" in den [^3H] Kanal berechnet. Die registrierten Impulse beider Strahler wurden entsprechend korrigiert.

3.9. Berechnung der Sedimentationskonstanten in Saccharose- und der Schwebbedichten in CsCl-Gradienten

Die Sedimentationskonstanten der einzelnen Partikel in Saccharosegradienten wurden nach R. C. Mc. Ewen⁴¹ berechnet. Als Variable gingen in die Berechnung ein: Rotor-dimensionen, Zentrifugationszeit, Umdrehungszahl, Temperatur, Anfangs- und Endkonzentration der Gradienten sowie die von den Partikeln zurückgelegte Wegstrecke.

Zur Berechnung der Schwebbedichten wurden zunächst im Abbé-Refraktometer (Zeiss) bei 25 °C die Brechungsindizes der einzelnen Fraktionen gemessen. Aus den Brechungsindizes n_D lassen sich nach C. I. Schildkraut et al.⁴² die Dichten ρ über folgende Formel bestimmen:

$$\rho_{25\text{ °C}} = 10,8601 n_{D,25\text{ °C}} - 13,4974$$

Eine Tabellierung der Brechungsindex-Dichte-Beziehung für CsCl-Lösungen bei 25 °C findet sich in der Literatur⁴³.

3.10. Elektronenmikroskopie

Die Proben zur Elektronenmikroskopie wurden in Anlehnung an M. J. Karnovsky⁴⁴ aufbereitet. Nach einstündiger Fixierung in 10 Volumen Puffer I (Gewicht/Volumen) und dreimaligem Auswaschen zur Entfernung überschüssigen Aldehyds in

Puffer II wurde je 0,2 g Material mit OsO_4 in ca. 1 ml Puffer III für 1 Stunde bei 0°C kontrastiert. Nach zweimaligem Auswaschen in Puffer II wurde das abzentrifugierte Sediment mit einigen Tropfen einer erwärmten 2 % wäßrigen Agar-Agar-Lösung versetzt, abgekühlt und in ca. 1 mm^3 große Würfel geschnitten.

Entwässert wurde in einer Äthanolreihe steigender Konzentration (50 %, 70 %, 80 %). Es folgte eine Nachkontrastierung durch Zugabe von 0,5 % Uranylazetat und eine weitere Entwässerung in 96 % Äthanol. Das Material wurde nach A. R. Spurr⁴⁵ in Epoxidharz ERL-4 206 eingebettet und im LKB Ultramikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden nach E. S. Reynolds⁴⁶ nochmals mit Bleicitrat nachkontrastiert und im Siemens Elektronenmikroskop 1 A photographiert.

3.11. Puffer

A Puffer: 0,02 m Triäthanolamin, 0,125 m KCl , $5 \cdot 10^{-3}$ m MgCl_2 , 0,25 m Saccharose, pH 7,5.

B Puffer: 0,02 m Triäthanolamin, 0,125 m KCl , $5 \cdot 10^{-3}$ m MgCl_2 , pH 7,5.

C Puffer: 0,02 m Triäthanolamin, 0,125 m KCl , pH 7,5.

S Puffer: 0,02 m Triäthanolamin, $1 \cdot 10^{-2}$ m KCl , $5 \cdot 10^{-3}$ m MgCl_2 , 1 % Formaldehyd, pH 7,5.

SE Puffer: 0,02 m Triäthanolamin, $1 \cdot 10^{-2}$ m KCl , 1 % Formaldehyd, pH 7,5.

Puffer I: 3 % Gluturaldehyd, 3 % Formaldehyd, 0,06 m Na-Cacodylat, 0,05 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,3.

Puffer II: 0,1 m Na-Cacodylat, pH 7,3.

Puffer III: 1 % OsO_4 , 0,1 m Na-Cacodylat, pH 7,3.

3.12. Chemikalien

Chemikalien folgender Firmen wurden verwendet:

[^{14}C] Uridin (482 mCi/mmol) und [$5\text{-}^3\text{H}$] Uridin (29,8 Ci/mmol),
The Radiochemical Center, Amersham/England.

Hyamin (1 m in Methanol), Fa. Packard Instrument International S. A., Zürich/Schweiz.

Omnifluor, Fa. New England Nuclear, Dreieichenhain/Frankfurt am Main.

Saccharose (frei von Ribonuclease), Triton X 100, Actinomycin D, Natriumdodecylsulfat und Epoxidharz ERL-4 206, Fa. Serva, Heidelberg.

EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) p. A., Triäthanolamin p. A., Formaldehyd (36 %) p. A., Trichloressigsäure p. A. und Rinderalbumin, Fa. Merck, Darmstadt.

Alle übrigen eingesetzten Substanzen wiesen den Reinheitsgrad p. A. auf. Lösungen von EDTA und Formaldehyd wurden vor Gebrauch mit KOH auf pH 7,5 eingestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Radioaktive Markierung der RNS

Bei Markierungen in vivo werden den Organismen im allgemeinen radioaktive Vorläufermoleküle angeboten, die dann über einen gewissen Zeitraum verstoffwechselt werden. Von den für eine Markierung von RNS in Frage kommenden Substanzen bietet das in der 5-Stellung [^3H]markierte Uridin den Vorteil, daß es spezifisch in RNS eingebaut wird. Eine Methylierung in der 5-Stellung zu Thymidin, das in DNS eingebaut wird, würde mit einem Verlust der Radioaktivität einhergehen.

Da die verschiedenen RNS-Arten zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation der Radioaktivität im Cytoplasma erscheinen, wurden am gleichen Embryo Markierungen über lange und kurze Zeiten mit [^{14}C] und [^3H]markiertem Uridin vorgenommen. Bei der Langzeitmarkierung über 24 Stunden wurden je 2 μCi [^{14}C]Uridin auf die Chorioallantoismembran getropft. Bei der Kurzzeitmarkierung über 15, 30 oder 60 Minuten mußten 300 μCi [$5\text{-}^3\text{H}$]Uridin intravenös injiziert werden. Nur durch diese Methode war gewährleistet, daß sich die Aktivität schnell und gleichmäßig im Organismus verteilte, so daß nach 15 Minuten bereits ein zum Nachweis ausreichender Anteil in die RNS eingebaut war.

4.2. Analyse der doppelmarkierten RNS mit Saccharosegradienten

Zur Untersuchung der Verteilung der eingebauten Radioaktivität nach einer Lang- und Kurzzeitmarkierung wurde der postmitochondriale Überstand in Saccharosegradienten zentrifugiert. Die Versuche wurden jeweils in Abwesenheit und in Gegenwart von EDTA durchgeführt.

Abb. 1 zeigt die Verteilung im Bereich der Ribosomen (80 S) sowie der großen (60 S) und der kleinen (40 S) Untereinheiten. Die [^{14}C] Langzeitmarkierung verläuft in allen Versuchen analog der Extinktion. Dies deutet darauf hin, daß die gesamte cytoplasmatische RNS, deren Hauptanteil die ribosomale RNS ausmacht, markiert ist. Der Verlauf der [^{14}C] Markierung folgt also wie die Extinktion im wesentlichen der Verteilung der ribosomalen RNS. Die Verteilung der [^3H] Aktivität (Kurzzeitmarkierung) unterscheidet sich eindeutig von der [^{14}C] Aktivität. Das weist darauf hin, daß nach 15 Minuten (Abb. 1 Ia) noch keine ribosomale RNS markiert ist und daß eine heterodisperse kurzzeitig markierte RNS über den ganzen Gradienten verteilt ist. Die 30 Minuten Markierung (Abb. 1 Ib) ist durch einen deutlichen Anstieg der [^3H] Aktivität in der kleinen ribosomalen Untereinheit (40 S) gekennzeichnet, was auf die Markierung der 18 S RNS zurückzuführen ist (siehe auch Abb. 6b). Nach 60 Minuten (Abb. 1 Ic) ist auch die 28 S RNS der großen ribosomalen Untereinheit (60 S) markiert (siehe auch Abb. 6c). Die Markierung der ribosomalen RNS hat hier bereits einen so großen Umfang erreicht, daß die kurzzeitig markierte, heterodisperse RNS verdeckt wird. Die spezifische Aktivität der Ribosomen (Impulse pro Minute/Extinktion $_{254\text{ nm}}$) ist sehr viel geringer. Dies könnte darauf hinweisen, daß

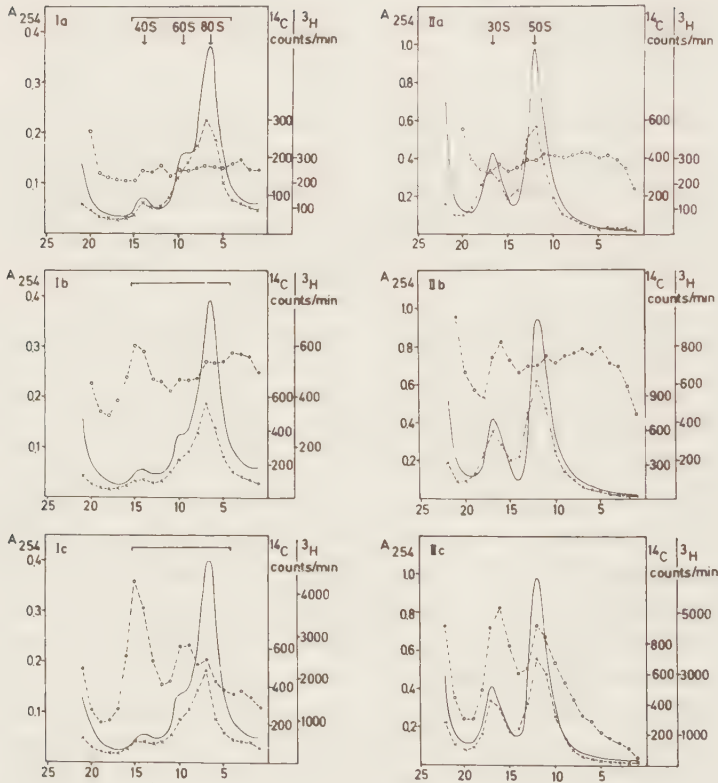


Abb. 1: Drei 11 Tage alte Hühnerembryonen wurden mit $2 \mu\text{Ci}$ [^{14}C]Uridin 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Langzeitmarkierung wurden $300 \mu\text{Ci}$ [^3H]Uridin intravenös injiziert und die Embryonen wieder für 15 (a), 30 (b) und 60 (c) Minuten inkubiert. Der postmitochondriale Überstand wurde zweigeteilt, wovon ein Teil 0,03 m an EDTA gemacht wurde (II). Saccharosegradienten: 10 - 30 % Saccharose in B Puffer (I) und in C Puffer (II). Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 41 Rotor für 3 Stunden bei 40 000 Umdrehungen/Minute und 0°C . — (A_{254}) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Minute [^{14}C]Uridin; -o-o- (counts/min) Impulse/Minute [^3H]Uridin.

bei der Synthese nicht ganze Ribosomen, sondern ribosomale Untereinheiten aus dem Kern in das Cytoplasma transportiert werden.

Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) bindet als Komplexbildner zweiwertige Ionen wie z. B. Mg^{2+} . Eine Behandlung des postmitochondrialen Überstandes mit EDTA (Abb. 1 IIa - c) führt zu einem vollständigen Zerfall der Polysomen und der Ribosomen in kleine und große ribosomale Untereinheiten. Jedoch erscheint die kleine Untereinheit nicht mehr bei 40 S, sondern bei ungefähr 30 S, und die große nicht mehr bei 60 S, sondern bei ungefähr 50 S. Dieses könnte entweder eine Konformationsveränderung oder aber einen Verlust an Proteinen bedeuten. Spätere Untersuchungen des Materials in CsCl-Gradienten werden zeigen, daß einige Proteine abgespalten werden, ihre Menge aber so gering ist, daß die Änderung der Sedimentationskonstanten dadurch allein nicht erklärt werden kann. Durch den Entzug von Magnesiumionen müssen die Untereinheiten auch in ihrer Konformation etwa im Sinne eines Auseinanderfallens verändert worden sein.

Ferner kann man der Abb. 1 IIb + c entnehmen, daß die neusynthetisierten kleinen Untereinheiten schneller sedimentieren als die "reifen" Untereinheiten. Dieses zeigt ein Vergleich der $[^3H]$ Aktivität, die die neusynthetisierten kleinen Untereinheiten darstellt, mit der Extinktion, die die durch EDTA-Behandlung und Zerfall von Monosomen und Polysomen entstandenen "reifen" Untereinheiten darstellt. Wie ebenfalls durch spätere Untersuchungen in CsCl-Gradienten gezeigt werden wird, liegt der Grund hierfür darin, daß die neusynthetisierten Untereinheiten einen höheren Proteingehalt als die "reifen" aufweisen. Von

größter Bedeutung ist, daß abgesehen von der kleinen Untereinheit nur ein geringfügiger Unterschied in der Verteilung der $[^3\text{H}]$ Aktivität mit und ohne EDTA-Behandlung nach 15 und 30 Minuten Markierung besteht. Die $[^3\text{H}]$ Aktivität charakterisiert also eine EDTA-resistente, heterodisperse, schnell markierte RNS in der Größe von 40 S bis 120 S, die, wie später beschrieben wird, als Ribonucleoprotein-Komplex im Sinne des Informosomenmodells vorliegt. Diese Partikel sind nicht an Ribosomen oder ribosomale Untereinheiten gebunden, da in diesem Falle durch die EDTA-Behandlung eine Aufspaltung erfolgt wäre, was zu einer Änderung der Radioaktivitätsverteilung geführt hätte.

Abb. 2 Ia - c zeigt die Verteilung der Radioaktivität des postmitochondrialen Überstandes im Bereich der Polysomen. Es wurde wieder eine Langzeitmarkierung über 24 Stunden mit $[^{14}\text{C}]$ Uridin und eine Kurzzeitmarkierung über 15, 30 und 60 Minuten mit $[^3\text{H}]$ Uridin vorgenommen. Die $[^{14}\text{C}]$ Aktivität folgt wieder der Extinktion bei 254 nm. Die $[^3\text{H}]$ Aktivität zeigt dagegen eine andere Verteilung. Neben der Markierung im oberen Teil des Gradienten, die auf die bereits gefundenen RNP-Partikel und auf t-RNS zurückgeht, ist ein beträchtlicher Teil der $[^3\text{H}]$ Aktivität nach 15 Minuten Markierung (Abb. 2 Ia) im Bereich der Polysomen zu finden. Nach einer Markierung von 30 und 60 Minuten (Abb. 2 Ib + c) nimmt die Aktivität zu, ohne daß sich die Verteilung wesentlich ändert. Die spezifische Aktivität der Ribosomen ist auch bei dieser Darstellung sehr gering.

Eine EDTA-Behandlung des postmitochondrialen Überstandes führt, wie bereits erwähnt, zur vollständigen Dissoziation von Polysomen und Monosomen in ribosomale Untereinheiten. Während die $[^{14}\text{C}]$ Aktivität dementsprechend zugunsten der Untereinheiten verschoben wird (Abb. 2 IIa - c), nimmt

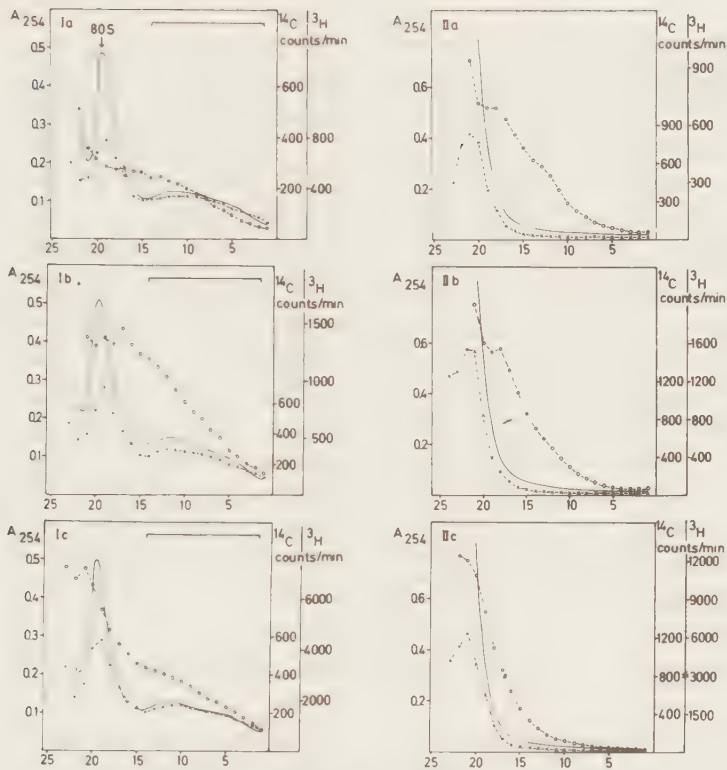


Abb. 2: Drei 11 Tage alte Hühnerembryonen wurden mit $2 \mu\text{Ci}$ ^{14}C Uridin 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Langzeitmarkierung wurden $300 \mu\text{Ci}$ ^3H Uridin intravenös injiziert und die Embryonen wieder für 15 (a), 30 (b) und 60 (c) Minuten inkubiert. Der postmitochondriale Überstand wurde zweigeteilt, wovon ein Teil 0,03 m an EDTA gemacht wurde (II). Saccharosegradienten: 10 - 30 % Saccharose in B Puffer (I) und in C Puffer (II). Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 41 Rotor für 2,5 Stunden bei 25 000 Umdrehungen/Minute und 0°C . — (A_{254}) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Minute ^{14}C Uridin; -o-o- (counts/min) Impulse/Minute ^3H Uridin.

die [^3H] Aktivität im Polysomenbereich aber nur um einen bestimmten Prozentsatz ab, der wiederum von der Markierungszeit und von der genauen Lage im Gradienten abhängt. Nach EDTA-Behandlung verringert sich die [^3H] Aktivität in der 150 S Region (Fraktion Nr. 14) nach einer 15 Minuten Markierung um ca 10 % (Abb. 2 I + IIa), nach einer 30 Minuten Markierung um ca. 50 % (Abb. 2 I + IIb) und nach einer 60 Minuten Markierung um ca. 75 % (Abb. 2 I + IIc). Im Bereich höher-molekularer Teilchen mit größeren S Werten ist nach EDTA-Behandlung ein stärkeres Absinken der [^3H] Aktivität zu beobachten. Demgemäß nimmt die Gesamtmenge der [^3H] Aktivität (Fraktionen Nr. 1 bis 15) um 30 % (15 Minuten), 60 % (30 Minuten) und 80 % (60 Minuten) ab. Die Tatsache jedoch, daß keine 100 %ige Abnahme zu beobachten ist, spricht eindeutig dafür, daß auch im Bereich der Polysomen eine EDTA-resistente, heterodisperse schnell markierte RNS existiert.

4.3. Schwebelichten der Ribonucleoprotein-Komplexe

Zur weiteren Untersuchung wurde die schnell markierte RNS aus dem 40 S bis 100 S Bereich und dem Polysomenbereich der Saccharosegradienten nach Fixierung mit Formaldehyd in isopyknischen CsCl-Gradienten bis zur Einstellung des Gleichgewichtes zentrifugiert (Abb. 3 + 4). Vorwegnehmend sei gesagt, daß die schnell markierte RNS in allen Fällen eine geringere Schwebelichte als ribosomales Material aufwies. Eine zum vollständigen Abbau von Protein führende Pronasebehandlung vor der Fixierung ließ die schnell markierte RNS bei der für "nackte" RNS typischen Dichte erscheinen. Hieraus folgt erstens, daß die schnell markierte RNS als Ribonucleoprotein-Komplex auftritt, und zweitens, daß dieser Ribonucleoprotein-Komplex einen höheren Proteingehalt als ribosomales Material aufweist.

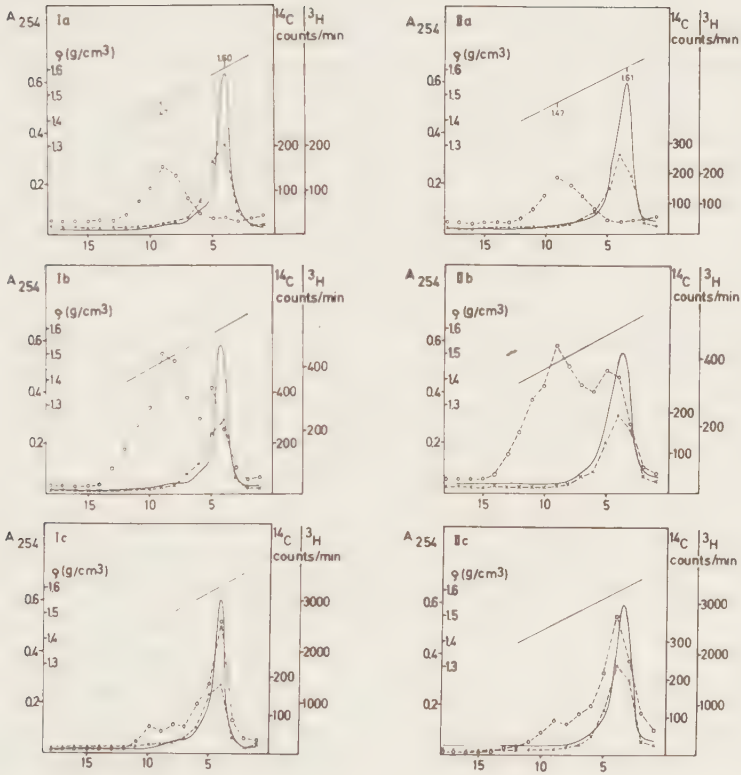


Abb. 3: 40 bis 100 S Material wurde entsprechend den Klammern in Abb. 1 Ia - c vereinigt und zweigeteilt, wovon ein Teil 0,03 m an EDTA gemacht wurde (II). Nach Zugabe von Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 6 % wurden die Lösungen 24 Stunden bei 2 °C inkubiert, 48 Stunden gegen S Puffer (I) oder SE Puffer (II) dialysiert und mit CsCl auf eine Konzentration von 42 % eingestellt. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 65 Rotor für 48 Stunden bei 50 000 Umdrehungen/Minute und 25 °C. — (A₂₅₄) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Minute [¹⁴C]Uridin; -o-o- (counts/min) Impulse/Minute [³H]Uridin.

Abb. 3 Ia - c zeigt die CsCl Gradienten mit den durch Klammern gekennzeichneten Fraktionen der Saccharosegradienten (Abb. 1 Ia - c) entsprechend dem Material von 40 S bis 100 S. Die schnell markierte RNS verteilt sich bei niedrigen Schwebedichten mit einem Maximum bei $\rho = 1,47 \text{ g/cm}^3$ (Abb. 3 Ia), während das ribosomale Material bei $\rho = 1,60 \text{ g/cm}^3$ liegt. Da unter den gegebenen Bedingungen RNS bei $\rho = 1,90 \text{ g/cm}^3$ und Proteine bei $\rho = 1,30 \text{ g/cm}^3$ binden, errechnet sich unter der Voraussetzung, daß die Komplexe nur aus Protein und RNS bestehen, ihr Proteingehalt in % aus der Gleichung:

$$\text{Protein \%} = \frac{1,90 - \rho}{0,006}$$

zu 50 % für ribosomales Material und zu 70 % bis 75 % für die schnell markierten Ribonucleoprotein-Partikel.

Nach 30 Minuten (Abb. 3 Ib) und nach 60 Minuten Markierung (Abb. 3 Ic) ist ein Anstieg der Radioaktivität des ribosomalen Materials zu beobachten, was auf die Markierung der ribosomalen RNS zurückzuführen ist. Die neusynthetisierte kleine Untereinheit, die sich in ihrer Radioaktivität nach 30 Minuten Markierung sehr gut absetzt, hat einen höheren Proteingehalt als die "reife" Untereinheit, da die $[^3\text{H}]$ Aktivität im Vergleich zur $[^{14}\text{C}]$ Aktivität oder zur Extinktion bei einer geringeren Schwebedichte liegt (Abb. 3 Ib). Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit dem bereits beschriebenen höheren Sedimentationswert in Saccharosegradienten (vergleiche Seite 23). Eine EDTA-Behandlung des Materials vor der Fixierung ergibt keine Änderung in der Verteilung der $[^3\text{H}]$ Aktivität (Abb. 3 IIa - c).

Das bedeutet, daß die schnell markierten RNP-Partikel nicht an ribosomale Strukturen gebunden sind. Wären nämlich die ohne EDTA-Behandlung beobachteten Partikel Komplexe aus RNP-Partikeln und ribosomalem Material, so wäre nach EDTA-Behandlung eine Verschiebung der freigesetzten nichtribosomalen RNP-Partikel zu geringeren Schwebedichten zu erwarten. Wie bereits erwähnt, wurde aber keine Änderung der Dichteverteilung beobachtet.

Abb. 4 Ia - c zeigt die CsCl-Gradienten mit den durch Klammern gekennzeichneten Fraktionen der Saccharosegradienten (Abb. 2 Ia - c) entsprechend dem Material aus dem Polysomenbereich. Nach 15 Minuten Markierung verteilt sich der größte Anteil der $[^3\text{H}]$ Aktivität (85 %) bei niedrigen Schwebedichten mit einem Maximum bei $1,47 \text{ g/cm}^3$, während die Polysomen, welche eine Schwebedichte von $1,59 \text{ g/cm}^3$ haben, nur geringe Aktivität aufweisen (Abb. 4 Ia). Dieses zeigt, daß der überwiegende Teil der schnell markierten RNP-Partikel nicht in Polysomen eingebaut ist.

Um eine eventuelle Dissoziation der Polysomen während der Fixierung und der CsCl-Gradientenzentrifugation auszuschließen, wurde das Polysomenmaterial aus den CsCl-Gradienten herausgenommen und nochmals auf Saccharosegradienten zentrifugiert. Das Ergebnis war, daß die Polysomen wieder an der gleichen Stelle erschienen. Das Experiment bewies also, daß die Polysomen intakt geblieben waren.

Nach der EDTA-Behandlung des Materials wird die gesamte $[^3\text{H}]$ Aktivität bei den RNP-Partikeln mit niedriger Schwebedichte gefunden (Abb. 4 IIa). Durch die Gegenwart von EDTA darf ausgeschlossen werden, daß diese sehr hochmolekularen RNP-Partikel an ribosomales Material gebunden sind.

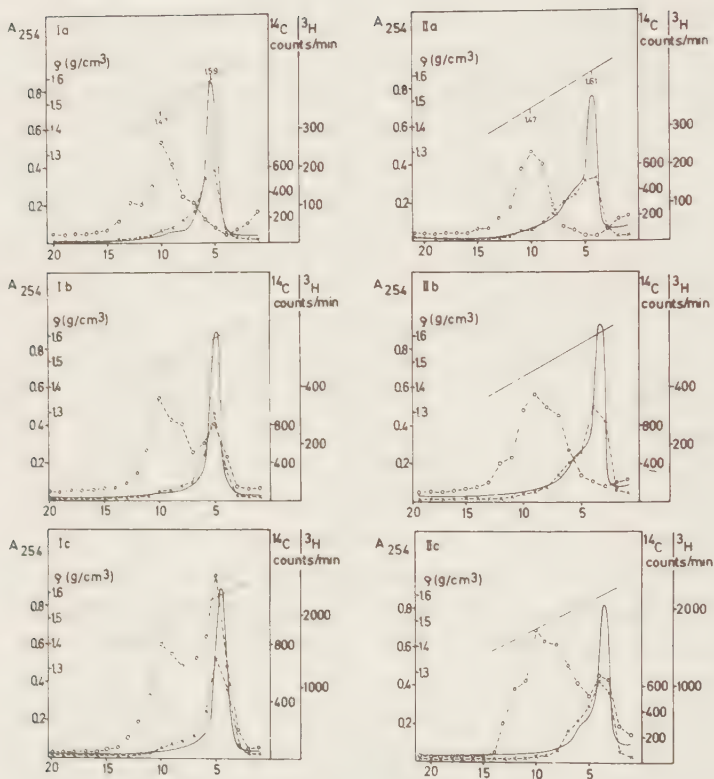


Abb. 4: Polysomales Material wurde entsprechend den Klammern in Abb. 2 Ia - c vereinigt und zweigeteilt, wovon ein Teil 0,03 m an EDTA gemacht wurde (II). Nach Zugabe von Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 6 % wurden die Lösungen 24 Stunden bei 2 °C inkubiert, 48 Stunden gegen S Puffer (I) oder SE Puffer (II) dialysiert und mit CsCl auf eine Konzentration von 42 % eingestellt. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 65 Rotor für 48 Stunden bei 50 000 Umdrehungen/Minute und 25 °C. — (A₂₅₄) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Minute [¹⁴C]Uridin; -o-o- (counts/min) Impulse/Minute [³H]Uridin.

Eine Markierung über 30 Minuten (Abb. 4 Ib) hat zur Folge, daß 40 % der $[^3\text{H}]$ Aktivität in den Polysomen und 60 % in den freien, hochmolekularen RNP-Partikeln mit dem Maximum bei einer Schwebedichte von $1,47 \text{ g/cm}^3$ gefunden werden. Da nach einer EDTA-Behandlung des Materials diese 40 % zu geringeren Dichten verschoben werden (Abb. 4 IIb), muß angenommen werden, daß es sich hierbei um messenger-RNS handelt. $[^3\text{H}]$ markiertes ribosomales Material hätte bei einer Dichte von $1,61 \text{ g/cm}^3$ liegen müssen. Darüber hinaus zeigt dieses Experiment, daß die messenger-RNS durch EDTA-Behandlung der Polysomen in Form eines RNP-Komplexes mit der Schwebedichte von $1,47 \text{ g/cm}^3$ freigesetzt wird. Nach 60 Minuten Markierung findet man 70 % der $[^3\text{H}]$ Aktivität bei den Polysomen (Abb. 4 Ic). Nach EDTA-Behandlung verbleiben 30 % bei dem ribosomalen Material (Abb. 4 IIc). Dieser Anteil stellt also $[^3\text{H}]$ markierte ribosomale RNS dar. 40 % werden zu einer Schwebedichte von $1,47 \text{ g/cm}^3$ verschoben. Hierbei handelt es sich wieder um messenger-RNP-Komplexe, die durch Polysomenspaltung freigesetzt werden. Zusammengefaßt gilt für die 60 Minuten Markierung also folgende Verteilung der $[^3\text{H}]$ Aktivität: 30 % in freien hochmolekularen RNP-Partikeln, 40 % in messenger-RNP-Partikeln, die in Polysomen eingebaut sind, und 30 % in ribosomalem Material.

4.4. Präparation des postmitochondrialen Überstandes in Gegenwart von Triton X 100

Ein 15 Minuten $[^3\text{H}]$ markierter Embryo wurde in Gegenwart von 0,5 % Triton X 100 (Octylphenoldecaäthylenglykol-äther), einem nichtionischen Detergens, homogenisiert. Die Zentrifugation des postmitochondrialen Überstandes auf einem Saccharosegradienten führte zu einer höheren

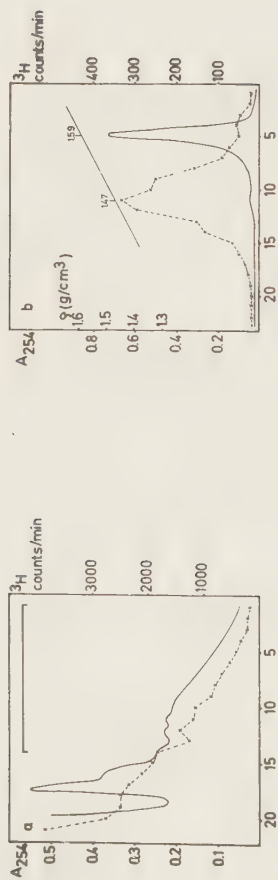


Abb. 5: 300 μCi [^3H]Uridin wurden einem 12 Tage alten Hühnerembryo intravenös injiziert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurde in Gegenwart von 0,5 % Triton X 100 homogenisiert und der postmitochondriale Überstand auf einem Saccharosegradienten zentrifugiert (a): 10 - 30 % Saccharose in B Puffer. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 41 Rotor für 2,5 Stunden bei 25000 Umdrehungen/Minute und 0 °C. Mit dem durch Klammern gekennzeichneten polysomalem Material wurde eine CsCl-Gradientenzentrifugation durchgeführt (b). Nach Zugabe von Formaldehyd wurde die Lösung 24 Stunden bei 2 °C inkubiert, 48 Stunden gegen S Puffer dialysiert und mit CsCl auf eine Endkonzentration von 42 % eingestellt. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 65 Rotor für 48 Stunden bei 50 000 Umdrehungen/Minute und 25 °C. — (A₂₅₄) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Minute [^3H]Uridin.

Ausbeute an Polysomen, speziell an leichteren, und zu einer höheren [^3H]Aktivität im Polysomenbereich (Abb. 5a). Zur weiteren Untersuchung wurde das Material aus dem Polysomenbereich mit Formaldehyd fixiert und einer CsCl-Gradientenzentrifugation unterworfen (Abb. 5b). Dabei ergab sich, daß wieder ca. 85 % der [^3H]Aktivität bei einer Schwebedichte von $1,47 \text{ g/cm}^3$ lagen (vergleiche Abb. 4 Ia). Die Homogenisation in Gegenwart von Triton X 100 führt also wohl zu einer höheren Ausbeute an [^3H]markiertem Material im postmitochondrialen Überstand, nicht aber zu einer qualitativen Änderung der Verteilung auf Saccharose- oder auf CsCl-Gradienten.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß auch stärkeres Homogenisieren in Abwesenheit von Triton X 100, beispielsweise mit 10 Strokes im locker eingepaßten Dounce Homogenisator, zu einer erhöhten Ausbeute an Polysomen und an radioaktivem Material führt. Eine Erklärung für diese Beobachtung wird anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchung (vergleiche Seite 40) möglich.

4.5. Extraktion der RNS aus dem postmitochondrialen Überstand

In einer weiteren Versuchsserie wurde nach der Phenol-Dodecylsulfat-Methode die RNS des postmitochondrialen Überstandes von Protein getrennt, d. h., die Ribonucleoprotein-Komplexe wurden gespalten. Die isolierte RNS wurde in Saccharosegradienten zentrifugiert.

Abb. 6 a - c zeigt die Verteilung der gesamten cytoplasmatischen RNS nach Phenolextraktion auf Saccharosegradienten. Die [^{14}C]Markierung verläuft analog der Extinktion. Die 18 S RNS der kleinen und die 28 RNS der großen ribo-

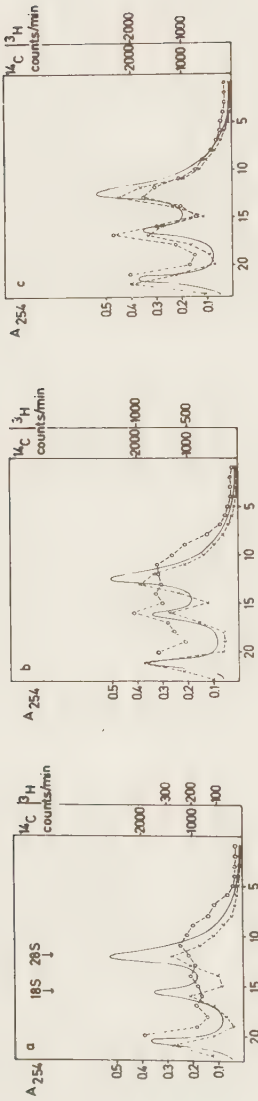


Abb. 6: Drei 11 Tage alte Embryonen wurden mit 2 μCi [^{14}C]Uridin 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Langzeitmarkierung wurden 300 μCi [^3H]Uridin intravenös injiziert und die Embryonen wieder für 15 (a), 30 (b) und 60 (c) Minuten inkubiert. Je 1 ml der post-mitochondrialen Überstände wurde zweimal mit 80 % Phenol- 1 % Natriumdodecylsulfat (Volumenverhältnis 1 : 1) für 10 Minuten bei 25 °C extrahiert. Die RNS wurde durch Zugabe von 2 Volumen 96 % Äthanol gefällt und zweimal mit 66 % Äthanol gewaschen. Der Niederschlag wurde in C Puffer aufgenommen. Saccharosegradienten: 10 - 30 % Saccharose in C Puffer. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 41 Rotor für 5 Stunden bei 40 000 Umdrehungen/Minute und 0 °C. — (A₂₅₄) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Minute [^{14}C]Uridin; -o-o- (counts/min) Impulse/Minute [^3H]Uridin.

somalen Untereinheit sind deutlich von einander abgesetzt. Nach 15 Minuten [^3H]Markierung (Abb. 6a) ist die schnell markierte RNS heterogen von ca. 20 S bis 35 S verstreut, wobei kleinere Mengen sogar noch bei ca. 60 S zu sehen sind. Es sind jedoch keine Anzeichen dafür vorhanden, daß die ribosomale RNS bereits markiert ist. Nach 30 Minuten Markierung (Abb. 6b) erscheint ein deutlicher Anstieg der [^3H]Aktivität in der ribosomalen 18 S RNS und nach 60 Minuten (Abb. 6c) ist auch die 28 S RNS der großen ribosomalen Untereinheit markiert. 18 S und 28 S RNS sind nach 60 Minuten bereits so hoch markiert, daß die schnell markierte heterodisperse RNS verdeckt wird.

Diese Versuche zeigen, daß die den schnell markierten Ribonucleoprotein-Komplexen zugrunde liegende RNS in ihrer Größenverteilung sehr heterogen ist. Das Maximum liegt bei etwa 30 S. Die Zeitfolge der Markierung der ribosomalen RNS-Arten steht in Übereinstimmung mit den aus den Saccharosegradienten gewonnenen Ergebnissen über die RNP-Partikel.

4.6. Intrazelluläre Lokalisation der Ribonucleoprotein-Komplexe

Anhand der nächsten Versuche sollte untersucht werden, ob die freien RNP-Komplexe im Cytoplasma in vivo vorkommen oder ob sie während des Homogenisierens aus den Kernen freigesetzt werden. Dazu wurden die Zellkerne eines 15 Minuten [^3H]markierten Embryos isoliert und durch 5 Strokes in einem locker eingepaßten Dounce-Homogenisator nochmals in Gegenwart und in Abwesenheit von nichtradioaktivem postmitochondrialen Überstand homogenisiert. Alle Homogenisationen, auch die zur Isolation der Zellkerne, wurden jeweils in Gegenwart und in Abwesenheit von



Abb. 7: 300 μCi ^3H Uridin wurden einem 12 Tage alten Hühnerembryo intravenös injiziert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurden die Kerne nach der auf S. 13 angegebenen Vorschrift isoliert und erneut mit 5 Strokes in A Puffer oder in nicht-radioaktivem postmitochondrialen Überstand homogenisiert. Sämtliche Homogenisationen wurden entweder in Gegenwart (a) oder in Abwesenheit (b) von Triton X 100 durchgeführt. Die Homogenisate wurden einmal bei 15 000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und die Überstände auf Saccharosegradienten (10 - 30 % Saccharose in B Puffer) gegeben. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 41 Rotor für 2,5 Stunden bei 25 000 Umdrehungen/Minute und 0 °C. -x-x- (counts/min) Impulse/Minute ^3H Uridin (Kerne homogenisiert in A Puffer); -o-o- (counts/min) Impulse/Minute ^3H Uridin (Kerne homogenisiert in nichtradioaktivem postmitochondrialen Überstand); -▲-▲- (counts/min) Impulse/Minute ^3H Uridin (postmitochondrialer Überstand; vergleiche Abb. 5a und 2 Ia).

Triton X 100 durchgeführt, um einen eventuellen Einfluß dieses Detergens beim Homogenisieren festzustellen. Nach einer Zentrifugation bei 15 000 x g zur Entfernung von Kernen sowie von Chromatin und eventuell noch vorhandenen Mitochondrien wurde das freigesetzte radioaktive Material auf Saccharosegradienten untersucht (Abb. 7a + b).

Die Verteilung der [^3H]Aktivität war in allen Fällen leicht unterschiedlich zu der des radioaktiven postmitochondrialen Überstandes. Die Hauptmenge des von der Kernfraktion freigesetzten radioaktiven Materials sedimentierte sehr langsam, bestand also aus kleineren Partikeln. Diese langsam sedimentierenden Partikel wurden auch bei einer rohen, sehr schnell isolierten Kernfraktion beobachtet, was ihre Entstehung durch enzymatischen Abbau während der Präparation sehr unwahrscheinlich macht.

Wenn beim Homogenisieren der Kerne Triton X 100 eingesetzt wird (Abb. 7a), ist die Menge des langsam sedimentierenden Materials sehr viel kleiner im Vergleich zu einer Verarbeitung ohne Triton X 100 (Abb. 7b). Jedoch ist in beiden Fällen der relative Anteil der höhermolekularen RNP-Partikel im Vergleich zu den kleineren im postmitochondrialen Überstand sehr viel größer.

Wenn die [^3H]markierten Kerne in Gegenwart von nichtradioaktivem postmitochondrialen Überstand homogenisiert werden, wird das Sedimentationsprofil etwas zu Gunsten schneller sedimentierender Teilchen verschoben (Abb. 7a + b). Für diesen Effekt bleibt es gleichgültig, ob Triton X 100 bei der Präparation zugegen war oder nicht. Ein Grund für diese Verschiebung konnte nicht gefunden werden. Davon unabhängige Versuche gaben kein Anzeichen für einen Ribonucleaseinhibitor im postmitochondrialen Überstand.

Es gibt bei unseren Versuchen keinen Grund zu der Annahme, daß der Abbau von Kern-RNP-Partikeln durch Zugabe von postmitochondrialem Überstand verhindert wird, wie es für Kerne und Überstand aus Rattenleberzellen berichtet wurde (I. Faiferman et al.⁴⁷). Die aus den Kernen freigesetzten RNP-Partikel könnten vielleicht an irgendwelche Bestandteile des postmitochondrialen Überstandes gebunden werden, so daß die hierbei entstehenden Komplexe etwas schneller sedimentieren.

4.7. Lokalisation der schnell markierten RNS innerhalb der Kerne

Um festzustellen, wo die schnell markierte RNS im Kern lokalisiert ist, wurde die Kernfraktion eines 15 Minuten [³H]markierten Embryos isoliert und mit 1 % Natriumdesoxycholat versetzt, um die Kernmembran zu zerstören. Diese Lösung wurde 15 Minuten bei 15 000 x g zentrifugiert. Danach fanden sich 85 % der gesamten [³H]Aktivität im Sediment.

Der Überstand wurde auf einem Saccharosegradienten weiter untersucht. Abb. 8 zeigt, daß das radioaktive Material aus dem Überstand im oberen Bereich des Gradienten verteilt ist. Die Menge dieser langsam sedimentierenden Aktivität ist zwei- bis dreimal höher als bei Kernen, die nicht in Gegenwart von Natriumdesoxycholat homogenisiert wurden. In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, daß eine Behandlung der Kerne mit Natriumdesoxycholat zu einem Abbau des Chromatins zu kleineren DNS-haltigen Strukturen führt (J. Born⁴⁸). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß Kern- und postmitochondriale RNP-Partikel nach Behandlung mit Natriumdesoxycholat einen Teil ihrer Proteine abdissoziieren (S. Olsnes⁴⁹). Beide Effekte könnten

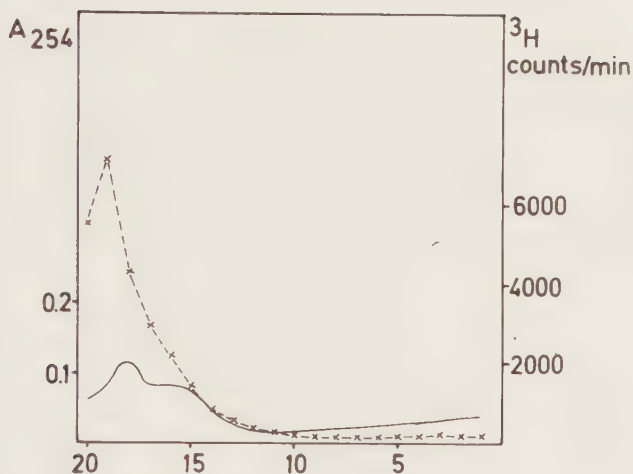


Abb. 8: 300 μCi [^3H]Uridin wurden einem 12 Tage alten Hühnerembryo intravenös injiziert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurden die Kerne nach der auf S. 13 angegebenen Vorschrift isoliert (ohne Triton X 100) und auf einen Saccharosegradienten (10 - 30 % Saccharose in B Puffer) gegeben. Das Material wurde auf dem Gradienten vorsichtig mit 1 % Natriumdesoxycholat verrührt. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 41 Rotor für 2,5 Stunden bei 25 000 Umdrehungen/Minute und 0 °C. — (A_{254}) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Minute [^3H]Uridin.

neben der Zerstörung der Kernmembran zu einem Anstieg der langsam sedimentierenden Aktivität beigetragen.

4.8. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Kerne im Rohhomogenisat

Es wurde je ein Embryo in einem locker eingefassten Dounce Homogenisator mit 5 bzw. 10 Strokes in Abwesenheit und mit 5 Strokes in Gegenwart von 0,5 % Triton X 100 homogenisiert. Das Rohhomogenisat wurde entsprechend der auf Seite 17 angegebenen Vorschrift zur Elektronenmikroskopie vorbereitet. Die Aufnahmen wurden bei 20 000facher Vergrößerung gemacht und 1 1/2fach nachvergrößert. Abb. 9 zeigt einen Kern aus einem mit 5 Strokes ohne Triton X 100 hergestellten Rohhomogenisat. Die Doppelmembran des Kernes ist gut erhalten. Von Bedeutung ist, daß von der Kernmembran cytoplasmatische Membranen ausgehen, die durch die Homogenisation nicht zerstört oder abgelöst worden sind. Diese Membranen umgeben optisch dichtere Räume und sind mit sehr vielen Partikeln, die Ribosomen, Polysomen und andere RNP-Partikel darstellen könnten, besetzt.

Abb. 10 zeigt einen Kern, aus einem Rohhomogenisat, das mit 10 Strokes hergestellt worden ist. Selbst unter diesen Bedingungen scheint die Doppelmembran des Kernes noch nicht zerstört zu sein. Die cytoplasmatischen Membranen sind jedoch abgerissen worden. Man darf weiter annehmen, daß ein Teil der an ihnen haftenden Partikel durch stärkeres Homogenisieren abgelöst wird. Die erhöhte Ausbeute an Polysomen und anderen RNP-Partikeln läßt sich mit Hilfe von Saccharosegradienten nachweisen (vergleiche Seite 33).

Ein Vergleich der beiden elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt, daß die Homogenisation mit 5 Strokes sehr

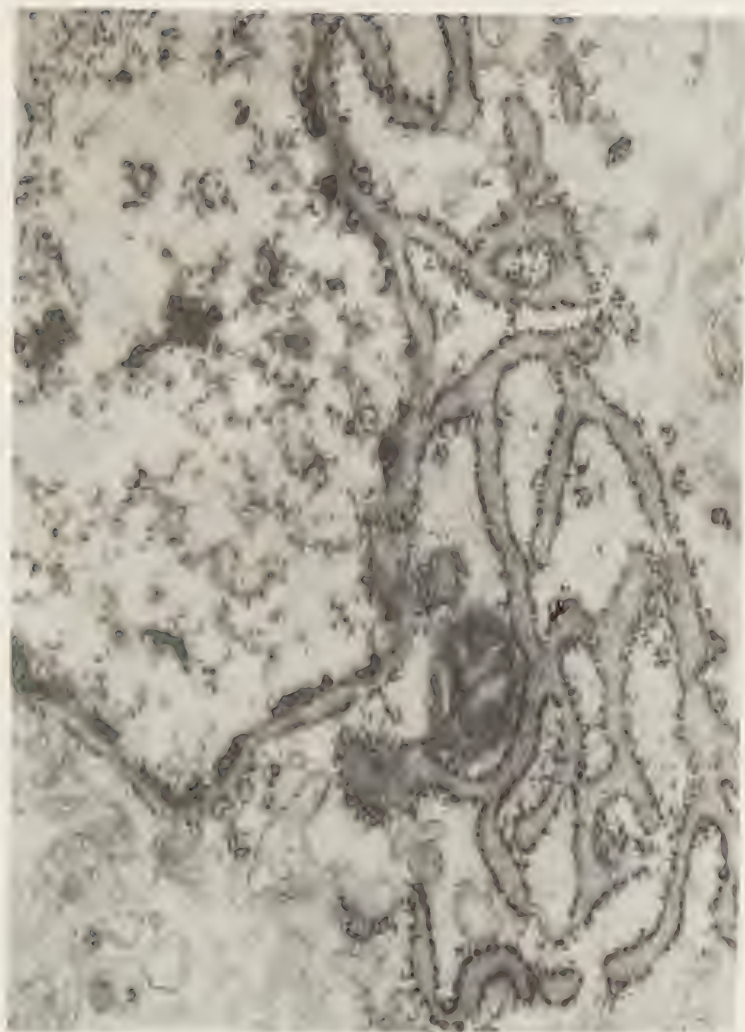


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Zellkerns aus Hühnerembryonenrohhomogenisat. Homogenisiert wurde mit 3 Strokes in einem locker eingepaßten Dounce Homogenisator. Vergrößerung: 20 000 x 1 1/2.

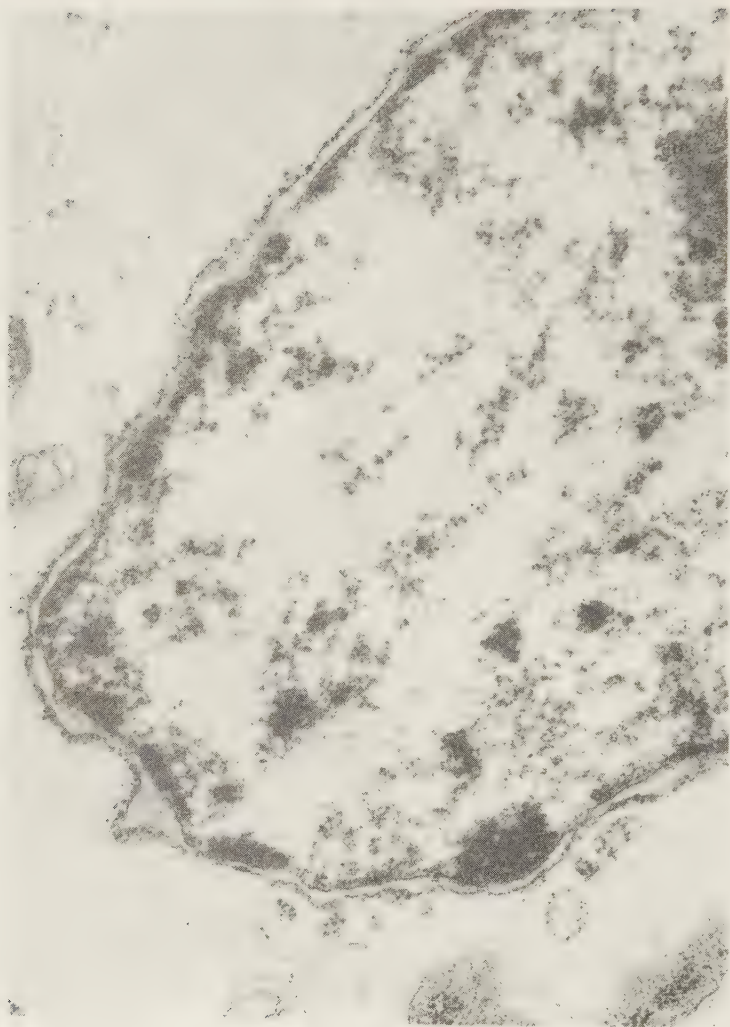


Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Zellkerns aus Hühnerembryonenrohhomogenisat. Homogenisiert wurde mit 10 Strokes in einem locker eingepaßten Dounce Homogenisator. Vergrößerung: 20 000 x 1 1/2.



Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Zellkerns aus Hühnerembryonenrohhomogenisat. Homogenisiert wurde in Gegenwart von 0,5 % Triton X 100 mit 5 Strokes in einem locker eingepaßten Dounce Homogenisator. Vergrößerung: 20 000 x 1 1/2.

schonend ist und daß nach Abzentrifugation der Kerne die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung des postmitochondrialen Überstandes durch Kernmaterial sehr gering ist. Diese Schlußfolgerung wird durch einen weiteren Versuch geschützt, bei dem die DNS mit [^3H]Thymidin markiert wurde. Eine Untersuchung des postmitochondrialen Überstandes auf [^3H]Aktivität ergab weniger als 0,5 % der Gesamtktivität. Selbst dieser geringe Anteil muß nicht unbedingt durch Kernverunreinigungen verursacht sein, da unspezifische Markierungen und das Vorhandensein von Spuren mitochondrialer DNS nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnten.

Abb. 11 zeigt einen Zellkern aus Rohhomogenisat, daß mit 5 Strokes in Gegenwart von Triton X 100 hergestellt wurde. Bei dieser Aufnahme ist deutlich zu erkennen, daß sich die äußere Kernmembran ablöst bzw. zum Teil schon abgelöst hat. Mit der Zerstörung der Kernmembran steht in Übereinstimmung, daß der Kerninhalt sehr viel aufgelockerter erscheint. Man muß annehmen, daß ein Teil des Chromatins aus dem Kern entwichen ist. Die cytoplasmatischen, von der Kernmembran ausgehenden Membranen, so wie die von ihnen eingeschlossenen optisch dichteren Räume, die bei Abb. 9 noch gut zu sehen waren, sind abgelöst bzw. verschwunden. Die an den Membranen lokalisierten Partikel sind zum größten Teil abdissoziiert. Diese Beobachtung gibt eine Erklärung für die auf Seite 33 getroffene Feststellung, daß eine Homogenisation in Gegenwart von Triton X 100 zu erhöhten Ausbeuten an Polysomen und schnell markierten RNP-Partikeln führt. Man muß dabei aber berücksichtigen, daß durch die Zerstörung der Kernmembran Teile des Kerninhalts, z. B. auch schnell markierte RNS, in den cytoplasmatischen Überstand entweichen können.

Es sollte noch erwähnt werden, daß die Kerne, die in Gegenwart von Triton X 100 gewonnen wurden, und somit frei von cytoplasmatischen Membranen sind, lichtoptisch im Phasenkontrastmikroskop eine glattere Oberfläche und ein regelmäßigeres Aussehen zeigen als die in Abwesenheit von Triton X 100 gewonnenen. Diese Beobachtung darf aber nicht zu dem falschen Schluß verleiten, daß es sich hierbei wirklich um unversehrte Kerne handelt.

4.9. Sensitivität der RNP-Partikel gegen Ribonuclease

Durch den nachfolgend beschriebenen Versuch sollte das Verhalten der RNP-Partikel gegen Ribonuclease untersucht werden, speziell, ob die schnell markierten RNP-Partikel dabei ein unterschiedliches Verhalten gegenüber ribosomalem Material besitzen. Es ist anzunehmen, daß während des Homogenisierens genügend zelleigene Ribonuclease freigesetzt wird, so daß auf einen Zusatz verzichtet wurde.

Der postmitochondriale Überstand eines 15 Minuten ^3H markierten Embryos wurde 3 Minuten bei 37°C inkubiert und danach einer Saccharosegradientenzentrifugation unterworfen. Abb. 12a + b zeigt den Vergleich zwischen den Gradienten von inkubiertem und nichtinkubiertem postmitochondrialen Überstand. Die schnell markierten RNP-Partikel sind weitgehend abgebaut worden. Die höhermolekularen Partikel werden durch Endo-Ribonucleasen gespalten, wobei die Menge des niedermolekularen Materials ansteigt. Allerdings ist dieser Anstieg nicht sehr hoch, so daß auch hier ein enzymatischer Abbau angenommen werden muß. Im Gegensatz dazu wird das ribosomale Material praktisch nicht angegriffen. Durch Abbau von messenger-RNS kommt es im Gegenteil zu einem leichten Anstieg von Disomen,

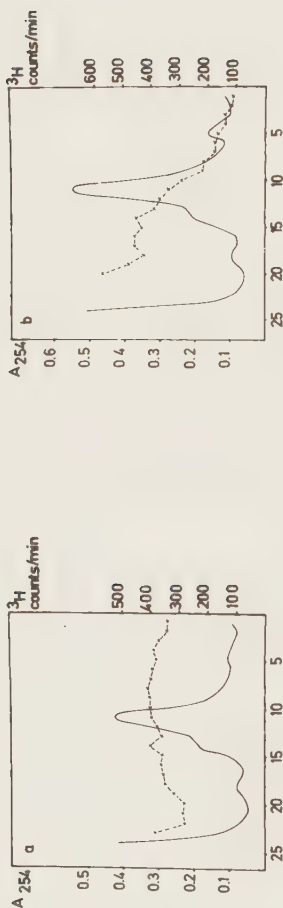


Abb. 12: Einem 12 Tage alten Hühnerembryo wurden 300 μ Ci [3 H]Uridin intravenös injiziert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurde der postmitochondriale Überstand geteilt, wovon ein Teil direkt (a) und ein Teil nach einer Inkubation von 3 Minuten bei 37 °C (b) auf einen Saccharosegradienten (10 - 30 % Saccharose in B Puffer) gegeben wurde. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 41 Rotor für 2,5 Stunden bei 40 000 Umdrehungen/Minute und 0 °C. — (A₂₅₄) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Minute [3 H]Uridin.

Monosomen und ribosomalen Untereinheiten. Der Versuch zeigt also, daß die heterodispersen schnell markierten RNP-Partikel im Vergleich zu ribosomalem Material sehr empfindlich gegen Ribonuclease sind.

4.10. Untersuchungen der RNP-Partikel nach Applikation von Actinomycin D

Ziel dieses Versuches war festzustellen, ob nach Applikation genügend hoher Dosen von Actinomycin, die zu einem Abbruch der Synthese von ribosomaler und heterodisperser RNS führen, und nachfolgender Inkubation über verschieden lange Zeiten die schnell markierte RNS zu anderen bereits definierten RNS-Arten abgebaut oder umgewandelt wird. Zu diesem Zweck mußte zunächst in einem Vorversuch die benötigte Ac D Dosis ermittelt werden. Bei gleichzeitiger Injection von 80 γ Ac D und 300 μ Ci [3 H]Uridin in die Chorio-allantoisvene eines Embryos konnten nach Inkubationszeiten von 15, 30 und 60 Minuten außer t-RNS keine markierten RNS-Arten im postmitochondrialen Überstand gefunden werden. Diese Dosis von 80 γ bewirkt also den Abbruch der Synthese der von uns untersuchten RNS-Arten.

Im eigentlichen Versuch wurde je ein 11 Tage alter Embryo 15 Minuten mit 300 μ Ci [3 H]Uridin inkubiert, im Anschluß daran wurden 80 γ Actinomycin D intravenös injiziert und der Embryo nochmals 60, 120 bzw. 240 Minuten inkubiert. Abb. 13 Ia - c zeigt die Saccharosegradienten des postmitochondrialen Überstandes für den polysomalen Bereich. Nach einer Inkubation von 240 Minuten hat die Menge der Polysomen deutlich abgenommen, was wahrscheinlich auf den Abbau der in ihnen vorhandenen messenger-RNS zurückzuführen ist.

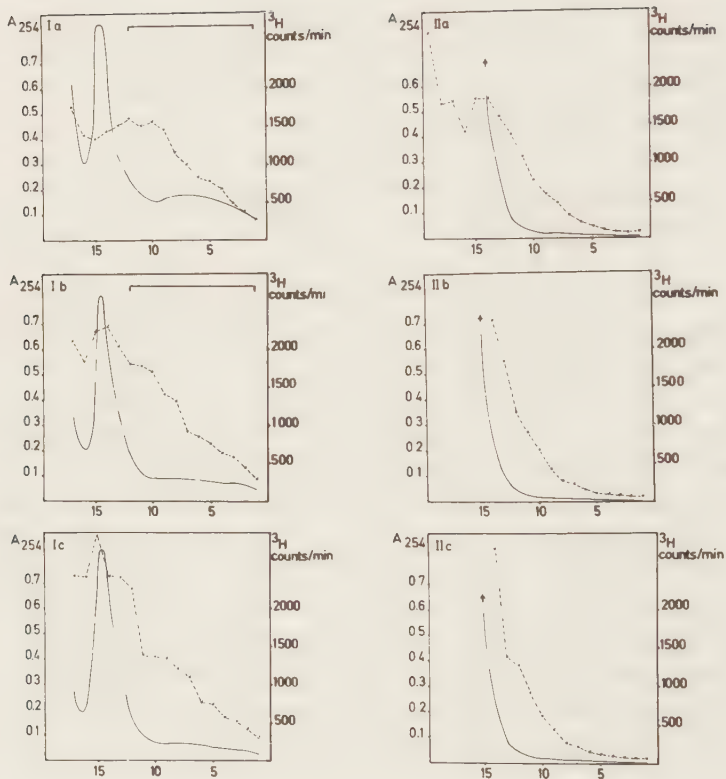


Abb. 13: Drei 12 Tage alten Hühnerembryonen wurden je 300 μCi [^3H]Uridin intravenös injiziert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurden 80 γ Actinomycin D injiziert und die Embryonen erneut für 60 (a), 120 (b) und 240 (c) Minuten inkubiert. Der postmitochondriale Überstand wurde zweigeteilt, wovon ein Teil 0,03 m an EDTA gemacht wurde (II). Saccharosegradienten: 10 - 30 % Saccharose in B Puffer (I) und in C Puffer (II). Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 41 Rotor für 2,5 Stunden bei 25 000 Umdrehungen/Minute und 0 °C. — (A₂₅₄) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Min. [^3H]Uridin.

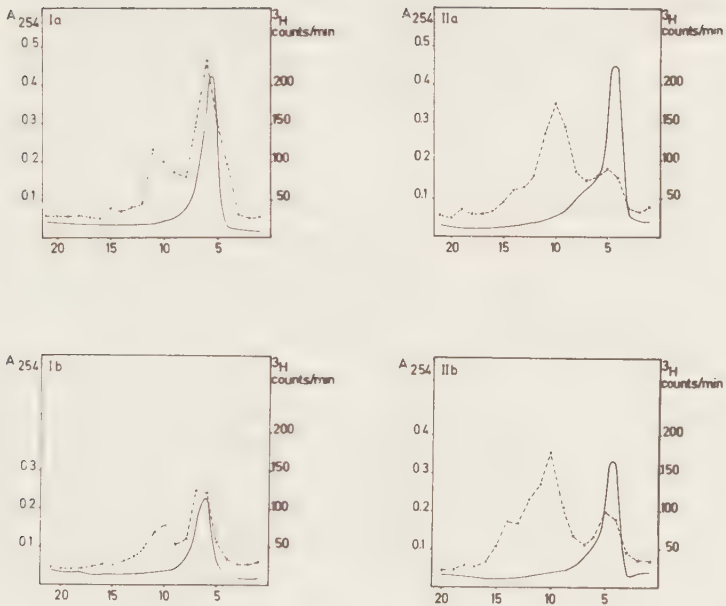


Abb. 14: Polysomales Material wurde entsprechend den Klammern in Abb. 13 Ia + b vereinigt und zweigeteilt, wovon ein Teil 0,03 m an EDTA gemacht wurde (II). Nach Zugabe von Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 6 % wurden die Lösungen 24 Stunden bei 2 °C inkubiert, 48 Stunden gegen S Puffer (I) oder SE Puffer (II) dialysiert und mit CsCl auf eine Konzentration von 42 % eingestellt. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 65 Rotor für 48 Stunden bei 50 000 Umdrehungen/Minute und 25 °C. — (A_{254}) Extinktion bei 254 nm; -x-x- (counts/min) Impulse/Minute [3H]Uridin.

Gegenüber einer 15 Minuten Inkubation mit $[^3\text{H}]$ Uridin hat die Gesamtaktivität im postmitochondrialen Überstand bei der Inkubation mit $[^3\text{H}]$ Uridin und nachfolgender Gabe von Ac D innerhalb der ersten 60 Minuten weiter zugenommen (vergleiche Abb. 2 Ia). Nach längeren Inkubationszeiten kommt es zu einem Anstieg der Aktivität im niedermolekularen Bereich.

Eine EDTA-Behandlung des postmitochondrialen Überstandes zeigt, daß nach 60 Minuten Inkubation (Abb. 13 IIa) 45 %, nach 120 und 240 Minuten (Abb. 13 IIb + c) 35 % der hochmolekularen Partikel nicht gespalten werden, also hochmolekulare RNP-Komplexe darstellen.

Um festzustellen, ob die durch EDTA-Behandlung zur Region der leichteren Partikel verschobene Aktivität ribosomale oder messenger-RNS darstellt, wurde von den durch Klammern gekennzeichneten vereinigten Polysomenfraktionen nach Fixierung mit Formaldehyd eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation vorgenommen. Abb. 14 Ia + b zeigt die CsCl-Gradienten des hochmolekularen Materials nach 60 bzw. 120 Minuten Inkubation mit Actinomycin D. Ca. 66 % der Aktivität liegen über den Polysomen, ca. 33 % liegen bei einer Dichte von $\rho = 1,47 \text{ g/cm}^3$.

Durch EDTA-Behandlung des Materials wird von der $[^3\text{H}]$ Aktivität, die bei den Polysomen lag, ca. 50 % zu der Dichte von $1,47 \text{ g/cm}^3$ verschoben (Abb. 14 IIa + b). Dieser Anteil muß als messenger-RNS angesehen werden, während die Aktivität, die bei den Polysomen bleibt, ribosomales Material darstellt. Von der gesamten Radioaktivität, die auf Saccharosegradienten mit den Polysomen sedimentiert, sind also 33 % m-RNS, 33 % r-RNS und 33 % freie hochmole-

kulare RNP-Partikel. Nach einer Inkubation von 60 Minuten mit [^3H]Uridin in Abwesenheit von Actinomycin D war die Gesamtaktivität zwar höher, die prozentuale Verteilung auf die einzelnen RNS Arten war jedoch sehr ähnlich (vergleiche Seite 31).

Eine Interpretation der Ergebnisse der Actinomycin D Versuchsreihe ist sehr schwierig, da viele unbekannte Größen einen Einfluß haben. Während der 15 Minuten Inkubation mit [^3H]Uridin wird im Zellkern eine große Menge RNS synthetisiert, die zwar noch nicht im postmitochondrialen Überstand ist, aber im Verlauf der Inkubation mit Actinomycin D aus dem Kern heraustransportiert werden kann. Das Auftreten von radioaktiver ribosomaler RNS im postmitochondrialen Überstand ist ein Beweis für diesen Vorgang. Aus den Versuchen läßt sich sowohl für die ribosomale als auch für die heterodisperse RNS ableiten, daß die Synthese in sehr viel kürzerer Zeit ablaufen muß als die Vorgänge der Modifikation und des Transportes in das Cytoplasma.

Das bedeutet aber, daß trotz Unterbrechung der Neusynthese die [^3H]markierte messenger-RNS, die während der Actinomycin D Inkubation in die Polysomen eingebaut wird, ebenfalls noch aus dem Kern stammen kann. Ein Abbau der hochmolekularen RNP- zu messenger-RNP-Partikeln ist aus den Versuchen nicht herzuleiten. Da aber keine genauen zeitlichen und mengenmäßigen Angaben über den Vorgang des Transports der RNP-Partikel in das Cytoplasma und ihre Halbwertszeit gegeben werden können, ist diese Beziehung andererseits auch nicht völlig auszuschließen.

5. Diskussion

Im cytoplasmatischen postmitochondrialen Überstand von Hühnerembryonen wurden nach Markierung mit [^3H]Uridin RNP-Partikel mit Sedimentationskonstanten bis über 200 S gefunden. Markierte ribosomale Untereinheiten und in Polysomen eingebaute Ribosomen erscheinen erst nach längerer Zeit im postmitochondrialen Überstand. Nach einer Markierung von 1 Stunde oder länger überwiegt jedoch die Menge des markierten ribosomalen Materials gegenüber den markierten heterodispersen RNP-Partikeln.

Von verschiedenen Autoren (E. H. Mc. Conkey und J. W. Hopkins⁵⁰, E. C. Henshaw⁵¹, W. K. Joklik und Y. Becker⁵²) wurde in Erwägung gezogen, daß die heterodispersen RNP-Partikel in Form eines Komplexes mit einer neusynthetisierten kleinen Untereinheit oder mit einem Ribosom vom Kern in das Cytoplasma transportiert werden. Unsere Versuche sprechen aus folgenden Gründen gegen diese Annahme: 1.) Komplexe aus Ribosomen und RNP-Partikeln dissoziieren nach Inkubation mit EDTA in ribosomale Untereinheiten und RNP-Partikel. Das Radioaktivitätsprofil in der Untereinheiten - Monosomen - wie auch in der Polysomenregion auf Saccharosegradienten zeigt jedoch nach EDTA-Behandlung keine merkliche Veränderung, vorausgesetzt, die Inkubationszeit ist so kurz (15 Minuten), daß keine nennenswerten Mengen an Radioaktivität in Monosomen oder Polysomen eingebaut sind (Abb. 1 I + IIa; Abb. 2 I + IIa). Für die Annahme von S. Olsnes²⁷, daß nach EDTA-Behandlung zumindest eine kleine Untereinheit an der messenger-RNS gebunden bleibt, gibt es keinen unwiderlegbaren experimentellen Beweis. 2.) Wie aus der Saccharosegradientenzentrifugation (Abb. 2 Ia) ersichtlich ist, variieren die Mole-

kulargewichte der RNP-Partikel sehr stark. Die Aktivitätsverteilung zeigt einen kontinuierlichen Abfall von niedermolekularen zu hochmolekularen Partikeln. In CsCl-Gradienten liegt das Maximum der RNP-Partikel bei einer Schwebedichte von $1,47 \text{ g/cm}^3$. Diese Dichte liegt erheblich unter der der Ribosomen und der ribosomalen Untereinheiten von $1,60 \text{ g/cm}^3$, denen demzufolge ein viel geringerer Proteinanteil zukommt.

Ein Komplex aus einer ribosomalen Untereinheit und einem sehr kleinen RNP-Partikel müßte ein Teilchen ergeben, dessen Dichte sehr nahe bei der Dichte des ribosomalen Materials liegt. Andererseits würde die Dichte eines Komplexes aus einer ribosomalen Untereinheit und einem sehr großen RNP-Partikel der Dichte der RNP-Partikel sehr ähnlich sein. Unter der Annahme, daß die RNP-Partikel an ribosomale Untereinheiten gebunden sind, müßte aufgrund der Größenverteilung in den Saccharosegradienten die Aktivitätsverteilung in den CsCl-Gradienten einen kontinuierlichen Abfall von der Dichte des ribosomalen Materials zu der Dichte der RNP-Partikel aufweisen. Die tatsächliche Verteilung mit dem Maximum bei einer Schwebedichte von $1,47 \text{ g/cm}^3$ spricht aber gegen diese Annahme. Dieses soll und kann natürlich nicht ausschließen, daß ein ganz geringer Anteil der RNP-Partikel im Rahmen der Initiation an eine ribosomale Untereinheit bzw. ein Ribosom gebunden ist.

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, daß J. B. Gurdon und D. D. Brown⁵³ durch Versuche mit einer nucleolenlosen *Xenopus laevis* Mutante gezeigt haben, daß die Synthese von Ribosomen und der Transport von messenger-RNS in das Cytoplasma nicht miteinander verbunden sind. Homozygotische Embryonen dieser Mutante weisen keine Ri-

bosomen-Synthese auf. Sie bilden jedoch messenger-RNS und entwickeln sich bis zum Schwanzknospenstadium normal.

Seit der Entdeckung der RNP-Partikel durch Spirin et al.¹⁵ wurde diskutiert, ob die RNP-Partikel Artefakte darstellen, die sich während der Homogenisation oder während der Formaldehyd-Fixierung bilden. Nucleinsäuren reagieren nämlich mit Proteinen bei Behandlung mit Formaldehyd zu künstlichen Nucleoprotein-Partikeln. Wenn die Ribonucleoprotein-Partikel jedoch vor der Fixierung z. B. durch Saccharosegradientenzentrifugation von anderen Proteinen abgetrennt werden, ist die Möglichkeit der Artefaktbildung weitgehend herabgesetzt.

Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, daß bestimmte cytoplasmatische Proteine während des Homogenisierens frei gesetzt werden, die mit zugegebener RNS künstliche RNP-Partikel bilden. Die Existenz dieser Proteine wurde kürzlich von D. Baltimore und A. S. Huang⁵⁴ sowie von A. S. Stepanov et al.⁵⁵ beschrieben. Es gibt jedoch kein Argument gegen die Annahme, daß diese Proteine in der Zelle bereits unter physiologischen Bedingungen an RNS gebunden sind. Darüber hinaus ist es unwahrscheinlich, daß alle Proteine, die an die RNS gebunden sind, während des sehr schonenden Homogenisierens aus bestimmten Zellkompartimenten freigesetzt werden und daß sie nicht schon vor dem Homogenisieren Bestandteile des Cytoplasmas gewesen sind.

Von besonderem Interesse ist das Auftreten der schnell markierten RNP-Partikel im polysomalen Bereich der Saccharosegradienten. Diese hochmolekularen Partikel waren bei Hühnerembryonen erstmals von D. Kabat und A. Rich⁵⁶

gefunden worden, die sie allerdings ohne Kenntnis des Proteingehalts fälschlich als reine Ribonucleinsäuren ansahen.

Ein entscheidendes Problem ist, ob diese RNP-Partikel in vivo Bestandteile des Cytoplasmas sind, oder ob sie während des Homogenisierens aus den Kernen freigesetzt werden, wie von R. P. Perry und D. E. Kelly¹⁷, G. Spohr et al.²⁴ sowie von S. Olsnes⁴⁹ behauptet worden ist. Stärkeres Homogenisieren oder Behandlung mit einem Detergens (Triton X 100) führt zu einem Anstieg des schnell markierten Materials im postmitochondrialen Überstand. Das kann erstens durch Kernverunreinigungen, zweitens aber durch ein Ablösen der RNP-Partikel von cytoplasmatischen Membranen erklärt werden.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen sprechen mehr für die zweite Möglichkeit. Bei den Kernen im Rohhomogenat weisen die äußeren Kernmembranen Ausläufer in das Cytoplasma auf, die dicht mit Partikeln besetzt sind. Diese Partikel stellen vermutlich Ribosomen, Polysomen und die schnell markierbaren RNP-Komplexe dar. Stärkeres Homogenisieren oder Behandlung mit Triton X 100 führt zu einer Freisetzung dieser Partikel, wobei in Abwesenheit des Detergens die Kernmembran intakt zu bleiben scheint. Die erhöhte Ausbeute an Polysomen und schnell markierten RNP-Partikeln nach Triton X 100 Behandlung (siehe Abb. 5) steht in Übereinstimmung mit diesem elektronenmikroskopischen Befund. Auf der anderen Seite weisen die in Gegenwart von Triton X 100 präparierten Kerne eine defekte Kernmembran auf, wobei sich insbesondere die äußere Kernmembran vollständig aufgelöst hat. Dieses könnte zu einer Freisetzung von Kern-RNP-Partikeln in das Cytoplasma geführt haben. Bei den Versuchen mit Triton X 100 kann da-

her eine Kernverunreinigung nicht ausgeschlossen werden.

Homogenisiert man isolierte und gereinigte Kerne, so werden RNP-Partikel freigesetzt. Die Größenverteilung dieser RNP-Partikel in Saccharosegradienten ist jedoch unterschiedlich zu der Verteilung der RNP-Partikel aus dem postmitochondrialen Überstand (siehe Abb. 7). Diese verschiedene Verteilung deutet ebenfalls darauf hin, daß die RNP-Partikel zumindest teilweise schon vor dem Homogenisieren im Cytoplasma sind.

Über die Existenz hochmolekularer, heterodisperser RNP-Partikel wurde jüngst von P. K. Sarkar und A. A. Moscona⁵⁷ sowie von A. Kumar und U. Lindberg⁵⁸ berichtet. Im Gegensatz zu diesen Autoren, die ohne Beweise das cytoplasmatische Vorkommen der RNP-Partikel herausstellen, gelang es G. Giudice et al.⁵⁹, durch vergleichende kinetische Markierungen von Kern und Cytoplasma tatsächliche Hinweise für die cytoplasmatische Existenz hochmolekularer RNS zu bekommen. Ihre Ergebnisse für die Größenverteilung der schnell markierten RNS aus Kern und Cytoplasma zeigen die gleiche Tendenz, wie die in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnisse für die RNP-Partikel. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß A. J. Aronson⁶⁰ im Cytoplasma Abbauprodukte der heterodispersen Kern-RNS gefunden hat. Eine cytoplasmatische Endonuclease, die an diesem Abbauprozess beteiligt sein könnte, wurde indentifiziert. Die Gegenwart dieser Endonuclease im Cytoplasma deutet darauf hin, daß zumindest ein Teil des Abbaus der hochmolekularen, heterodispersen Kern-RNS stattfand, nachdem die RNS den Kern verlassen hatte.

Obwohl ein endgültiger Beweis noch nicht gegeben werden konnte, deuteten diese Ergebnisse doch alle auf die tat-

sächliche Existenz hochmolekularer, heterodisperser RNP-Partikel im Cytoplasma hin.

Zur Untersuchung, wo die neusynthetisierte RNS im Kern lokalisiert ist, wurden die Kerne nach Zerstörung der Kernmembran mit Natriumdesoxycholat einer niedertourigen Zentrifugation unterworfen. Eine Radioaktivitätsmessung ergab, daß 85 % der neusynthetisierten RNS an sehr große Strukturen, vermutlich an Chromatin, gebunden sind.

Ein Zusammenhang zwischen dieser hochmolekularen, heterodispersen Kern-RNS, die von K. Scherrer und L. Marcaud¹² sowie von G. P. Georgiev¹³ entdeckt wurde, der hochmolekularen sowie der niedermolekularen cytoplasmatischen RNS-Partikel und den in Polysomen eingebauten messenger-RNP-Partikeln konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgedeckt werden, kann aber nach den vorliegenden Ergebnissen auch nicht ausgeschlossen werden.

Von Interesse wird die Aufklärung der Funktion des Proteinanteils der RNP-Partikel sein. Grundsätzlich sind folgende Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen:

a.) Schutz vor RNase Abbau. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Partikel gegen RNase (siehe Seite 45) erscheint diese Möglichkeit nicht sehr wahrscheinlich.

b.) Transportfunktion. Untersuchungen von E. M. Lukanidin et al.⁶¹ und C. Morel et al.⁶² haben eindeutig gezeigt, daß den Kern-RNP-Partikeln andere Proteine als den cytoplasmatischen Partikeln zugrunde liegen. Wenn die Kern-RNP-Partikel Vorläufer der cytoplasmatischen Partikel sein sollen, muß an der Kernmembran ein Austausch der Proteine erfolgen. Eine Transportfunktion der Proteine wird durch

diesen Austausch aber nicht sehr wahrscheinlich gemacht.

c.) Beteiligung an der Regulation der Proteinbiosynthese. Obwohl in der Literatur bisher noch nicht berichtet wurde, daß RNP-Partikel in in vitro Proteinbiosynthesesystemen zu einer Stimulierung führten, ist eine Funktion der Proteine bei der Regulation der Translation nicht auszuschließen. Ferner ist eine Beteiligung bei der Zelldifferenzierung in Betrachtung zu ziehen.

6. Zusammenfassung

Der Einbau von radioaktivem Uridin in Ribonucleoprotein-Partikel wurde an 12 Tage alten Hühnerembryonen untersucht. Zur Differenzierung der einzelnen RNS-Arten wurde eine Langzeitmarkierung von 24 Stunden mit $[^{14}\text{C}]$ Uridin und eine Kurzzeitmarkierung von 15, 30 und 60 Minuten mit $[^3\text{H}]$ Uridin vorgenommen.

Durch die Analyse der $[^{14}\text{C}]$ und der $[^3\text{H}]$ Doppelmarkierung mittels Saccharose- und CsCl-Gradienten konnte gezeigt werden, daß im postmitochondrialen Überstand RNP-Partikel vorkommen, die kein ribosomales Material darstellen. Diese Partikel werden sehr schnell markiert, zeigen eine heterodisperse Größenverteilung, haben einen Proteingehalt von ca. 75 %, sind resistent gegen EDTA-Behandlung und sehr empfindlich gegenüber RNase. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie mit den von Spirin et al.¹⁵ beschriebenen Informosomen vergleichbar.

Die schnell markierten nichtribosomalen RNP-Partikel konnten nicht nur in der 40 - 100 S Region der Saccharosegradienten, sondern auch im polysomalen Bereich identifiziert werden. Sie sind ebenfalls resistent gegen EDTA-Behandlung und binden in CsCl-Gradienten bei einer Schwebedichte von $1,47 \text{ g/cm}^3$, entsprechend einem Proteinanteil von 75 %. Dieses Protein/RNS Verhältnis von 75 %/25 % ist beträchtlich höher als das des ribosomalen Materials. Ribosomen binden in CsCl-Gradienten bei einer Schwebedichte von $1,60 \text{ g/cm}^3$. Das entspricht der bei Eukaryonten postulierten Zusammensetzung von 50 % Protein und 50 % RNS. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellkerne sowie durch Vergleich der Größenverteilung der schnell markier-

ten RNP-Partikel aus Kern und Cytoplasma wurden Hinweise dafür erhalten, daß die hochmolekularen RNP-Partikel auch in vivo im Cytoplasma vorkommen und nicht, wie von mehreren Autoren ^{17, 24, 49} behauptet, beim Homogenisieren aus den Kernen freigesetzt werden.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten findet man 40 % und nach 60 Minuten 60 % der schnell markierten, nichtribosomalen Partikel in die Polysomen eingebaut. Dieser Anteil stellt höchstwahrscheinlich messenger-RNS dar. Nach Dissoziation der Polysomen durch EDTA-Behandlung konnte gezeigt werden, daß auch m-RNS in Form eines Ribonucleoproteineinkomplexes vorliegt, der als solcher bei der Polysomenbildung erhalten bleibt.

Ein Zusammenhang zwischen den cytoplasmatischen, hochmolekularen RNP-Partikeln und den m-RNP-Partikeln konnte in einer Versuchsreihe mit Actinomycin D, das zur Unterbrechung der RNS-Synthese führt, nicht nachgewiesen werden, darf nach den vorliegenden Ergebnissen aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Freie heterodisperse RNP-Partikel wurden nach Zerstörung der Kernmembran mit Natriumdesoxycholat auch in Zellkernen gefunden. Der größte Anteil der schnell markierten RNS (ca. 85 %) ist hier aber an sehr hochmolekulare Strukturen gebunden, die vermutlich Chromatin darstellen.

7. Literaturverzeichnis

1. E. Harbers, Nucleinsäuren; Biochemie und Funktion, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1969) 98.
2. R. H. Burdon und H. E. Clason, J. Mol. Biol., 39 (1969) 113.
3. D. E. Bernhardt und J. E. Darnell, J. Mol. Biol., 42 (1969) 43.
4. J. E. Kay und H. L. Cooper, Biochim. Biophys. Acta, 186 (1969) 62.
5. S. Altman, Nature, 229 (1971) 19.
6. D. Söll, Science 173 (1971) 293.
7. V. Daniell, S. Sarid, J. Beckman und U. Littauer, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 66 (1970) 1260.
8. D. S. Carre, S. Litvak und F. Chapeville, Biochim. Biophys. Acta, 224 (1970) 371.
9. D. Grierson, M. E. Rogers, M. L. Sartirana und U. E. Loenig, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXXV (1970) 589.
10. M. E. Mirault und K. Scherrer, FEBS letters, 20 (1972) 233.
11. D. Chen, G. Schultz und E. Katchalski, Nature New Biol., 231 (1971) 69.
12. K. Scherrer und L. Marcaud, J. Cell Comp. Physiol., 72 Suppl. 1 (1968) 181.
13. G. P. Georgiev, J. Theoret. Biol. 25 (1969) 473.

14. R. Soeiro und J. E. Darnell,
J. Cell. Biol., 44 (1970) 467.
15. A. S. Spirin, N. V. Belitsina und M. A. Ajtkhozhin,
Zh. Obshch. Biol, 25 (5) (1964) 321
und Übersetzung in: Fed. Proc., 24 (1965) T 907.
16. G. Altardi, H. Parnas, M. J. Hwang und B. Attardi,
J. Mol. Biol., 20 (1966) 145.
17. R. P. Perry und D. E. Kelley,
J. Mol. Biol., 35 (1968) 37.
18. F. C. Kafatos,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 59 (1968) 1251.
19. E. C. Henshaw,
J. Mol. Biol., 36 (1968) 401.
20. A. S. Spirin,
European J. Biochem., 10 (1969) 20.
21. A. Burny, G. Huez, G. Marbaix und H. Chantrenne,
Biochim. Biophys. Acta, 190 (1969) 228.
22. G. Cartouzou, J. C. Poiree und S. Lissitzky,
European J. Biochem., 8 (1969) 357.
23. E. C. Henshaw und J. Loebenstein,
Biochim. Biophys. Acta, 199 (1970) 405.
24. G. Spohr, N. Granboulan, C. Morel und K. Scherrer,
European J. Biochem., 17 (1970) 296.
25. D. Fromson und M. Nemer,
Science, 168 (1970) 266.
26. S. Y. Lee, V. Krsmanovic und Brawerman,
Biochemistry, 10 (1971) 895.
27. S. Olsnes,
European J. Biochem., 18 (1971) 242.

28. B. Lebleu, G. Marbaix, G. Huez, J. Temmerman,
A. Burny und H. Chantrenne,
European J. Biochem., 19 (1971) 264.
29. D. M. Woodcock und J. N. Mansbridge,
Biochim. Biophys. Acta, 240 (1971) 218.
30. M. A. Ajtkhozhin, N. V. Beletsina und A. S. Spirin,
Biokhimiya, 29 (1964) 169.
31. D. D. Brown und E. Littna,
J. Mol. Biol., 8 (1964) 688.
32. P. Emerson und T. Humphreys,
Develop. Biol., 23 (1970) 86.
33. L. H. Goldberg und P. A. Friedman,
Ann. Rev. of Biochem., 40 (1971) 775.
34. R. P. Perry,
Exp. Cell Res., 29 (1963) 400.
35. P. Georgiev, O. P. Samarina, M. I. Lerman,
M. N. Smirnov und A. N. Severtzov,
Nature (London), 200 (1963) 1291.
36. S. Penman,
J. Mol. Biol., 17 (1966) 177.
37. H. S. Kirby,
Biochem. J., 64 (1956) 405.
38. H. Tiedemann und H. Tiedemann,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 306 (1956) 132.
39. F. Gros, W. Gilbert, H. H. Hiatt, G. Attardi, P. F.
Spahr und J. D. Watson,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXVI (1961) 111.
40. A. S. Spirin, N. V. Belitsina und M. I. Lerman,
J. Mol. Biol., 14 (1965) 611.

41. C. R. Mc Ewen,
Analytical Biochemistry, 20 (1967) 114.
42. C. L. Schildkraut, J. Marmur und P. Doty,
J. Mol. Biol., 4 (1962) 438.
43. H. A. Sober und R. A. Harte,
Handbook of Biochemistry, The Chemical Rubber Co.,
Cleveland, 1968, p. J-252.
44. M. J. Karnovsky,
J. Cell Biol., 27 (1965) 137 A.
45. A. R. Spurr,
J. Ultrastructure Research, 26 (1969) 31.
46. E. S. Reynolds,
J. Cell Biol., 17 (1963) 208.
47. I. Faierman, M. G. Hamilton und A. O. Pogo,
Biochim. Biophys. Acta, 204 (1970) 550.
48. J. Born,
unveröffentlicht.
49. S. Olsnes,
Biochim. Biophys. Acta, 213 (1970) 149.
50. E. H. Mc. Conkey und J. W. Hopkins,
J. Mol. Biol., 14 (1965) 257.
51. E. C. Henshaw,
J. Mol. Biol., 14 (1965) 241.
52. W. K. Joklik und Y Becker,
J. Mol. Biol., 13 (1965) 511.
53. J. B. Gurdon und D. D. Brown,
J. Mol. Biol., 12 (1965) 27.
54. D. Baltimore und A. S. Huang,
J. Mol. Biol., 47 (1970) 263.

55. A. S. Stepanov, A. S. Voronina, L. P. Orchinnikov
und A. S. Spirin,
FEBS letters, 18 (1971) 13.
56. D. Kabat und A. Rich,
Biochemistry, 8 (1969) 3742.
57. P. K. Sarkar und A. A. Moscona,
Develop. Biol., 26 (1971) 187.
58. A. Kumar und U. Lindberg,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 69 (1972) 681.
59. G. Giudice, G. Sconzo, F. Ramirez und J. Albanese,
Biochim. Biophys. Acta, 262 (1972) 401.
60. A. J. Aronson,
Nature New Biol., 235 (1972) 40.
61. E. M. Lukanidin, G. P. Georgiev und R. Williamson,
FEBS letters, 19 (1971) 155.
62. C. Morel, B. Kayibanda und K. Scherrer,
FEBS letters, 18 (1971) 84.

Lebenslauf

Am 7. 2. 1945 wurde ich, Walter Knöchel, als erster Sohn des Arztes Dr. med. Walter Knöchel und seiner Ehefrau Marianne, geb. Ewald, in Marburg an der Lahn geboren.

1949 verlegten meine Eltern unseren Wohnsitz nach Essen, wo ich von 1951 bis 1955 die Albert-Schweitzer-Grundschule besuchte. Von Ostern 1955 an besuchte ich das Helmholtz-Gymnasium in Essen. Dort bestand ich im März 1964 die Reifeprüfung.

Zum Sommersemester 1964 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Chemie. 1966 bestand ich die Vordiplomprüfung. Gleichzeitig begann ich, als zweites Fach Humanmedizin zu studieren. 1967 bestand ich das Vorphysikum. 1969 absolvierte ich die Diplomhauptprüfung in Chemie. In meiner Diplomarbeit befaßte ich mich unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Broser mit der "Metallorganischen Synthese einiger isomerenfreier m-methylierter Aurine". 1970 bestand ich die ärztliche Vorprüfung.

Mein Interesse sowohl an der Chemie als auch an der Medizin veranlaßte mich, während meiner Dissertation an einer biochemischen Problemstellung zu arbeiten. Seit April 1970 bin ich Doktorand bei Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann und wissenschaftlicher Assistent am Institut für Physiologische Chemie der Freien Universität Berlin.

